

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra experimentální biologie rostlin**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Zdeňka Češpírová**

Změny ve struktuře listu vyvolané působením troposférického ozónu.

Leaf structural changes induced by tropospheric ozone.

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Zuzana Lhotáková, PhD.

Konzultanti: prof. RNDr. Jana Albrechtová, PhD.

Mgr. Eva Neuwirthová

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2018

Podpis:

## Poděkování:

Velice ráda bych poděkovala své školitelce paní Mgr. Zuzaně Lhotákové, PhD. za podporu, trpělivost a podnětné postřehy. Dále bych chtěla poděkovat svým konzultantkám paní prof. RNDr. Janě Albrechtové, PhD. za cenné rady a optimismus a paní Mgr. Evě Neuwirthové za povzbuzení a čas, který mi věnovala. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala celému výzkumnému týmu Ekofyziologické anatomie rostlin, který mě vždy podržel a pomohl mi pochopit vše, čemu jsem nerozuměla.

## **Abstrakt:**

Troposférický ozon je významným polutantem vznikajícím fotochemickými reakcemi oxidů dusíku za spolupůsobení ultrafialového záření. Jeho koncentrace v ovzduší se díky probíhající klimatické změně a činnosti člověka, především spalováním fosilních paliv, zvyšuje. Jedná se o vysoce reaktivní molekulu rozpadající se na kyslíkové radikály, jejichž působení má negativní vliv na fyziologické funkce a strukturu listů rostlin.

Do listu vstupuje ozon průduchy a dále poté reaguje s buňkami a jejich jednotlivými kompartmenty. Produkty vzniklé jeho rozpadem jsou schopny štěpit membrány a způsobovat další oxidativní poškození, jako např. hromadění plastoglobulů v chloroplastech, poškozovat tvar chloroplastů, mitochondrií nebo peroxizomů. Na listech v makroskopickém měřítku jsou patrné léze, chlorózy a nekrózy, pod vlivem ozonu také dochází k rychlejší senescenci listů.

Cílem práce je shrnout poznatky o změnách ve struktuře listu vyvolané působením troposférického ozonu na různých anatomických úrovních od organel po celý orgán, dále tato práce přibližuje fyziologické mechanismy, které k těmto poškozením vedou.

**Klíčová slova:** ozón, oxidativní stres, struktura listu, mezofyl, reaktivní formy kyslíku, signalizace

## **Abstract:**

Tropospheric ozone is an important pollutant formed by the photochemical reactions of ultraviolet radiation and nitrogenous. Recently, its concentration in the air is increasing due to the promoting climate change and antropogenic activities, mainly because of combustion of the fossil fuels. The ozone is highly reactive molecule degrading to the reactive oxygen species having negative effects on the leaf physiological functions and structure.

Ozone penetrates the leaf through the stomata, thereafter it reacts with the cells and their singular compartments. The products formed due to ozone degradation are able to cause the disintegration of plasma membranes and other oxidative damage, for example accumulation of plastoglobuli inside the chloroplasts, changes in the shape of chloroplasts, mitochondria or peroxisomes. At the macroscopic level the visible lesions, chloroses and necroses are observed. In addition, the faster senescence of leaves is observed under the effect of ozone.

The main aim of present thesis is to review knowledge of the ozone-induced changes in the leaf structure beginning on the cell structure level and ending at the whole plant body level and to explain physiological mechanisms leading to these damages.

**Key words:** ozone, oxidative stress, leaf structure, mesophyll, reactive oxygen species, signalling

## Seznam použitých zkratk:

Buněčná stěna – BS

Etylén – ET

Kyselina abscisová – ABA

Kyselina askorbová – AsA

Kyselina jasmínová – JA

Kyslík – O<sub>2</sub>

Malondialdehyd – MDA

Peroxid vodíku – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Oxid dusičitý – NO<sub>2</sub>

Oxid dusný – NO

Ozon – O<sub>3</sub>

Reaktivní formy kyslíku – ROS

Superoxid – O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, O<sub>2</sub><sup>2-</sup>

## Obsah

1.	Úvod .....	8
2.	Ozón .....	8
2.1.	Vznik O <sub>3</sub> v atmosféře .....	9
2.2.	Toxicita ozónu .....	10
3.	Fyziologické mechanismy působení ozónu.....	11
3.1.	Mechanismy transportu ozónu do mezofylu .....	13
	Reakce svěřacích buněk průduchů na působení ozónu.....	13
	Reakce ozónu s buněčnou stěnou .....	15
3.2.	Signalizace .....	15
3.1.1.		
3.1.2.	Změny koncentrace Ca <sup>2+</sup> iontů .....	16
	Fytohormony.....	16
3.2.1.		
3.2.2.	3.3. Detoxifikace listu, poškození a opravné systémy .....	17
	Sekundární působení ozónu v buňkách .....	18
3.3.1.	Působení antioxidantů .....	19
3.3.2.		
4.	Změny ve struktuře listu vyvolané působením ozónu.....	20
4.1.	Změny na buněčné úrovni .....	21
4.1.1.	Změny v chloroplastech.....	22
4.1.2.	Změny v mitochondriích.....	24
4.1.3.	Změny v peroxizomech .....	25
4.1.4.	Změny ve vakuole.....	25
4.1.5.	Změny v buněčné stěně.....	26
4.2.1.		
4.2.2.	4.2. Změny na úrovni pletiva .....	28
	Pokožka.....	28
4.3.1.	Mezofyl a cévní svazky .....	29
4.3.2.		
	4.3. Změny na úrovni celé rostliny .....	31
	Makroskopická poškození listů .....	32
	Efekt pozice listů v koruně stromu při poškození způsobeném zvýšenou koncentrací O <sub>3</sub> .....	33
5.	Vliv ontogeneze na citlivost k O <sub>3</sub> , aklimace .....	34
6.	Závěr.....	35
	Seznam zdrojů a použité literatury .....	36

## 1. Úvod

Ozón se ve vzduchu vyskytuje přirozeně především ve stratosféře, kde tvoří ozónovou vrstvu. Objevuje se také v troposféře, kde jsou jeho přirozené koncentrace velmi nízké. V posledních letech se však díky lidské činnosti, především spalováním fosilních paliv, uvolňuje do vzduchu vysoké množství oxidů dusíku, které za spoluúčasti UV záření tvoří prekurzory pro tvorbu ozónu. Díky těmto reakcím koncentrace ozónu ve vzduchu stoupá a ozón se tak stává jedním z důležitých plynů znečišťujících ovzduší.

Díky své nestabilitě a vysoké reaktivitě je ozón nebezpečným polutantem štěpícím plazmatické membrány ale i další kompartmenty buněk. V případě listů rostlin vstupuje ozón do mezofylu průduchy, kde se rozpadá na reaktivní formy kyslíku navozující zejména oxidativní stres, který vede k poškození listu.

Rostlina se oxidativnímu stresu vyhýbá zavíráním průduchů, jejich odlišným uspořádáním v rámci pokožky listu, tloušťnutím buněčné stěny, nebo celkovým zmenšením plochy listů, u rostlin také často dochází ke zvýšené senescenci (Bussotti Filippo et al., 2005; Dai et al., 2017; McAdam et al., 2017; Pääkkönen et al., 1996; Pellegrini et al., 2015a). Celkově všechny tyto změny mohou vést k menší tvorbě biomasy a nižším výnosům rostliny, poškození se také může projevit na pozdější produktivitě rostliny, nebo jejímu celkovému horšímu fyziologickému stavu.

Cílem této práce je podat přehled o anatomických změnách ve struktuře listu navozených působením přízemního ozónu. Dále také přibližuje fyziologické mechanismy, které k těmto změnám v listech vedou, a v závěru se zabývá reakcemi rostliny z dlouhodobého hlediska, tedy pozorovaným aklimacím a změnám patrných na listech.

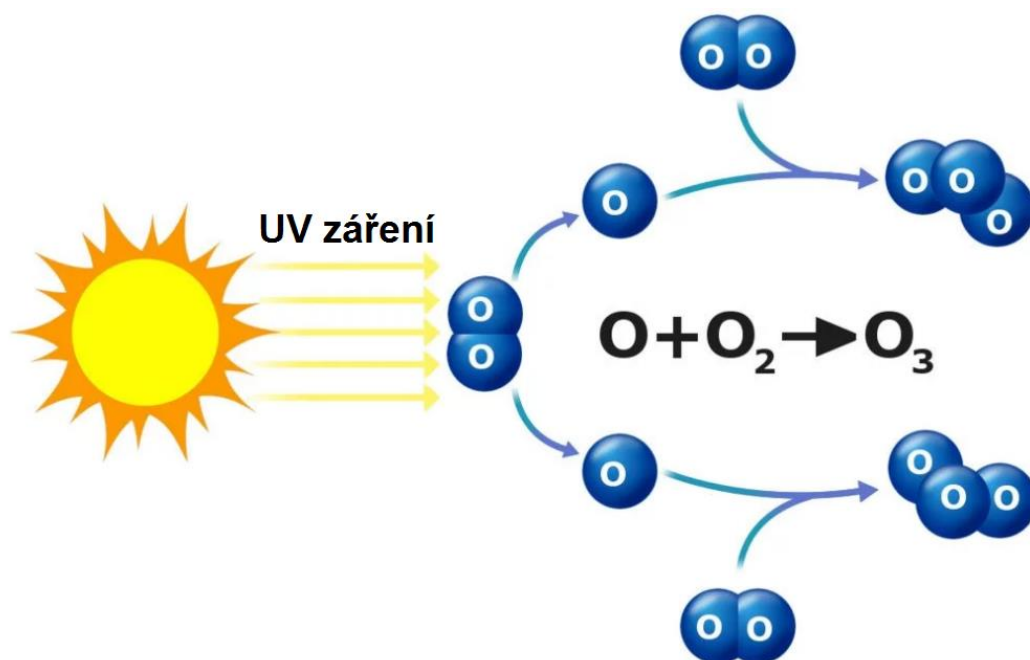
## 2. Ozón

Ozón ( $O_3$ ) je modrý plyn skládající se ze tří atomů kyslíku. Přirozeně jej můžeme najít v horních vrstvách atmosféry (ve stratosféře), kde tvoří tzv. ozónovou vrstvu vznikající z molekul kyslíku ( $O_2$ ) za pomoci UV záření. Tato vrstva chrání povrch Země před nadbytečným dopadem UV záření.  $O_3$  se také vyskytuje přirozeně v troposféře v malém množství, kdy obvykle vzniká před bouřkou (tzv. ozonizace vzduchu), může však také vznikat i vlivem lidské činnosti, kdy jeho koncentrace ve vzduchu nepřírozeně stoupá (Krupa and Manning, 1988).



## 2.1. Vznik O<sub>3</sub> v atmosféře

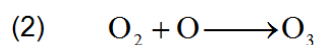
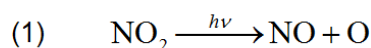
O<sub>3</sub> vzniká ve stratosféře reakcí molekul kyslíku s fotony ultrafialového záření, při které se O<sub>2</sub> rozštěpí na dva atomy, které dále reagují s dalšími molekulami O<sub>2</sub> za vzniku tříatomové molekuly ozónu podle Obrázku 1.



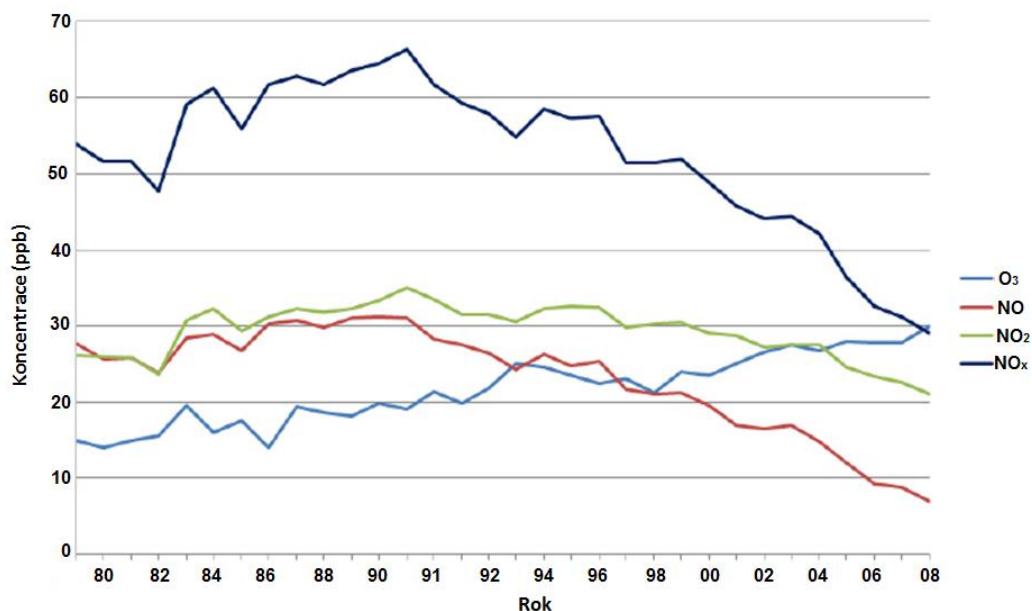
Obrázek 1 – Schéma vzniku ozónu z fotochemickou reakcí molekul kyslíku za spolupůsobení UV záření. Převzato a upraveno z Science ABC (2018)

Podobnou reakcí vzniká O<sub>3</sub> také přirozeně v troposféře, jeho koncentrace jsou však malé; přibližně se jedná o koncentrace 20 – 60 ppb (parts per billion), což jsou jednotky, které se používají při měření velmi nízkých koncentrací, 1 ppb znamená jednu částici z miliardy (Krupa and Manning, 1988). Navíc je O<sub>3</sub> velmi nestálý plyn, rozpadá se na molekuly O<sub>2</sub>.

V posledních letech je však pozorován nárůst přízemního ozónu (obrázek 2). Toto zvýšení je přičítáno vlivu znečištění ovzduší lidskou činností a také globálnímu oteplování – O<sub>3</sub> může vznikat reakcemi různých molekul, především methanu, nestálých nemethanových organických sloučenin, oxidu uhelnatého a oxidu dusičitého (NO<sub>2</sub>), který je významným polutantem produkovaným ve vyšší míře díky dopravě a spalování fosilních paliv. NO<sub>2</sub> při krátkovlnném záření (záření o délce 280 – 430 nm) disociuje za vzniku oxidu dusného (NO) a kyslíkového radikálu, který dále reaguje s kyslíkem za vzniku O<sub>3</sub>, dle rovnic 1 a 2 (Jolivet et al., 2016).



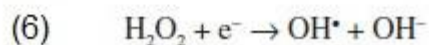
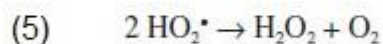
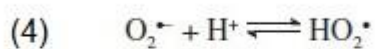
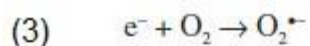
*Rovnice 1 a 2, převzato a upraveno podle (Veselý, 2011)*



*Obrázek 2 – Koncentrace ozónu (O<sub>3</sub>) a jeho prekursorů, oxidů dusíku (NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>) v atmosféře od roku 1980 do roku 2010. Převzato a upraveno podle (Al Razi and Moritomi, 2013)*

## 2.2. Toxicita ozónu

O<sub>3</sub> je plynem velmi nestálým, který se po krátké době rozpadá za vzniku molekuly O<sub>2</sub>, ale také samotného atomu kyslíku, který dále reaguje podle rovnic 3 - 6. Touto cestou vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), které zahrnují superoxid (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hydroxylový radikál (OH<sup>•</sup>), hydroperoxyl (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) nebo peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



*Rovnice 3 – 6, převzato a upraveno podle (Praus et al., 2012)*

ROS jsou vysoce reaktivními molekulami, které jsou schopné reagovat s různými organickými sloučeninami a tím poškozovat buňky a jejich fyziologické a metabolické procesy. Jako příklad můžeme uvést např. peroxidaci lipidů plazmatické membrány, díky které se kontinuita plazmatické membrány naruší a může dojít k porušení buňky, nebo rovnou k vylití buněčného obsahu a buněčné smrti (Gao et al., 2016a). Narušení plazmatické membrány buněk však není jediná negativní reakce, která se může po vystavení buňky ozónu objevit. Další poškození jsou popsána a shrnuta v následujících kapitolách.

Protože je  $O_3$  velmi reaktivní molekulou, která se poměrně rychle rozpadá na ROS, jsou ROS hlavními molekulami interagující s biomolekulami a buněčnými strukturami a zároveň jsou to ROS, co primárně spouštějí odpověď rostliny na způsobený stres. V dalším textu však jako původce stresu bude souhrnně označována molekula  $O_3$ .

### 3. Fyziologické mechanismy působení ozónu

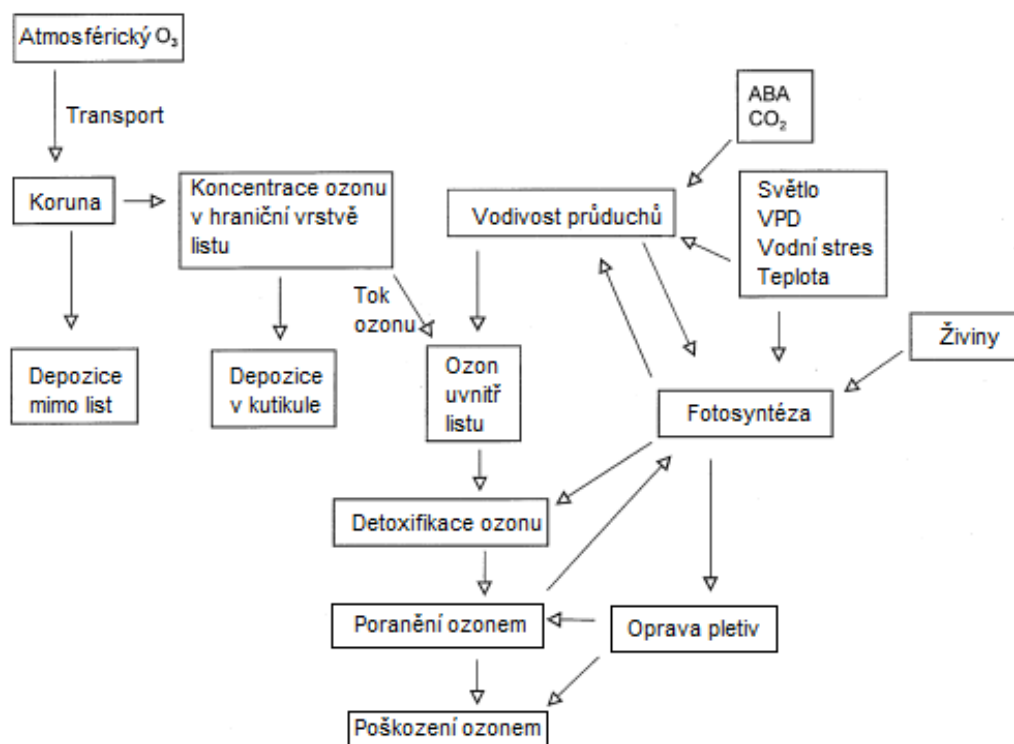
Všem zaznamenaným buněčným poškozením v rámci buňky, listu a celé rostliny předchází množství dílčích mechanismů, ve kterých  $O_3$  figuruje (Obrázek 3). Poté, co  $O_3$  vyvolá negativní reakce ve strukturách listu vedoucí k jeho poškození, dochází ve vyšší míře k senescenci listu (Pellegrini et al., 2015b), nebo k opravným mechanismům. Další možností je detoxifikace pletiv ještě před tím, než  $O_3$  buňky listu poškodí. K této detoxifikaci dochází prostřednictvím reakcí, které molekulu  $O_3$  redukují. Zároveň chemické reakce můžou do jisté míry opravovat  $O_3$  poškozená pletiva, tyto opravy jsou však náročnější než jejich detoxifikace (Musselman and Massman, 1998).

V úvodu můžeme uvést například princip, jakým  $O_3$  proniká do struktury listu a zároveň mechanismus, jakým tomuto pronikání rostlina zabraňuje. Jedná se o aktivní zavírání průduchů (Dai et al., 2017), nebo tloustnutí buněčné stěny (Alves et al., 2016), přes kterou je však vstup ozónu velmi znesnadněn (Oksanen et al., 2004a), v případě pokožky zejména díky kutikule, kterou  $O_3$  nedokáže do listu penetrovat. Dále na zvýšené množství  $O_3$  odpovídá buňka změnou koncentrace iontů, dochází k inhibici nebo naopak aktivaci iontových kanálů (Kadono et al., 2010; Torsethaugen et al., 1999), nebo zvýšení jejich cytosolické koncentrace (Vaultier and Jolivet, 2015). V odpovědi na stres u rostlin se podílí především kyselina abscisová, která svojí zvýšenou koncentrací indukuje zavírání průduchů (McAdam et al., 2017), ale také další fytohormony, jako je např. kyselina jasmínová, kyselina salicylová, nebo

etylén, které spouštějí reakci specifickou pro napadení patogeny, avšak při reakci na zvýšenou koncentraci O<sub>3</sub> ve vzduchu byly tyto mechanismy pozorovány též (Cotrozzi et al., 2017).

Je také poněkud diskutabilní, jestli všechny objevené a popsané změny ve struktuře listu a chování rostliny jsou způsobené přímo ozónem, protože molekuly O<sub>3</sub> mají díky své vysoké reaktivitě poměrně nízkou životnost. Ozón nedokáže penetrovat přes plazmatickou membránu a téměř okamžitě se rozpadá (Heath and Taylor, 1997). Reaguje však s buněčnými složkami (ozón např. indukuje peroxidaci lipidů v plazmatických membránách (Yang et al., 2017a)) za vzniku ROS v apoplastu. Tyto molekuly se dále hromadí v organelách a způsobují další změny ve struktuře listu. Je tedy otázkou, jestli většina těchto změn vzniká přímým působením ozónu, nebo nepřímo přes tyto reaktivní formy, jejichž vznik však indukuje.

Na poškození O<sub>3</sub> reaguje rostlina detoxifikací (např. reakce kyseliny askorbové (AsA), která působí jako antioxidační činidlo (Yang et al., 2017b)), přizpůsobením (např. tloušťnutí buněčné stěny nebo snížené otevírání průduchů (Alves et al., 2016; Dai et al., 2017)) a v případě dlouhodobého stresu, se kterým se již rostlina nedokáže vypořádat, dochází k poškození, které zahrnuje různé deformace buněčné stěny, chloroplastů, nebo desintegraci mitochondrií. Štěpením lipidů se tvoří malondialdehyd (MDA), který se akumuluje v buňkách a jeho množství se odvíjí od míry poškození buňky, což umožňuje použít jej jako marker oxidativního poškození membrán. Míra poškození listu závisí na množství antioxidačních činidel v listu, tloušťce buněčné stěny, nebo dynamice zavírání průduchů, a citlivost k působení O<sub>3</sub> je druhově specifická (např. kvajáva hrušková (*Psidium guajava* L.) a tabák virginský (*Nicotiana tabacum* L.) (Alves et al., 2016)). Kupříkladu opadavé stromy odpovídají na koncentraci zvýšeného ozónu jinak, než stromy stálezelené; můžeme uvést rozdíly mezi druhy rodu *Quercus*: opadavým dubem pyrenejským (*Quercus pyrenaica* Willd) a stálezeleným dubem cesmínovitým (*Quercus ilex* L.) (Calatayud et al., 2011a). Někdy se citlivost liší mezi různými kultivary v rámci jednoho druhu; zde jako příklad můžeme užít broskvoň (*Prunus persica* L.) jejíž nektarinkové odrůdy jsou vůči působení ozónu tolerantnější než odrůdy s pravými broskvemi (Dai et al., 2017).



Obrázek 3 – Schéma fyziologického působení ozónu ve struktuře listu stromu. Převzato a upraveno podle (Musselman and Minnick, 2000)

### 3.1. Mechanismy transportu ozónu do mezofylu

Ozón poškozuje vnitřní struktury listu, od pletiva jakožto celku až po jednotlivé buňky. Produkty jeho rozkladu reagují s organelami a způsobují změny na ultrastrukturní úrovni listu. Prvním místem výměny plynů a působení  $O_3$  se stává pokožka na straně listu, kde se nacházejí průduchy, díky kterým se ozón dále dostává do vnitřních struktur listu, kde dochází k dalším interakcím  $O_3$  s buněčnými strukturami.

Za hlavní místo vstupu  $O_3$  do listu jsou považovány průduchy, u listů jsou však také pozorovány mechanismy ukládání v kutikule (Jolivet et al., 2016). Pro rostlinu je  $O_3$  nebezpečnou látkou, která působí jak negativní změny v jejím fungování, tak změny v anatomii i morfologii vedoucí až k deformaci listů.

#### Reakce svěracích buněk průduchů na působení ozónu

Rostlinné průduchy nejsou pasivními kanály, které by propouštěly dovnitř do buňky, nebo naopak ven z buňky libovolné množství plyných látek, aniž by se na tomto procesu aktivně podílely. Naopak se jedná o dynamické systémy svěracích buněk, které reagují na různé stimuly a zavření průduchů vyvolává pokles jejich vodivosti pro plyny (Calatayud et al.,

2011b; Zhang et al., 2014a). Za takový stimul můžeme považovat např. nízkou vzdušnou vlhkost či nedostatečné množství vody v půdě.

Průduchy vybraných kultivarů broskvoně na vstup  $O_3$  reagovaly zavřením, což umožnilo snížit množství polutantu vstupujícího do listového mezofylu. U části studovaných kultivarů broskvoně však byly pozorovány i odlišné výsledky, kdy se naopak průduchy působením ozónu otevřely (Dai et al., 2017). Tato reakce je závislá na mnoha faktorech, jako je např. koncentrace ozónu ve vzduchu, stáří listů nebo jejich celková odolnost vůči vzdušnému znečištění. Další možnou reakcí na zvýšenou koncentraci  $O_3$  je změna v dynamice zavírání průduchů. Při vystavení pajasanu, jasanu a platanu zvýšenému množství ozónu v okolní atmosféře po delší čas bylo pozorováno pomalejší zavírání průduchů. Výsledky tohoto pozorování vedou k závěru, že zvýšené množství  $O_3$  může zpomalovat dynamiku zavírání průduchů (Hoshika et al., 2014).

Ve studii (Yang et al., 2017a) bylo během pokusů na aksamitníku (*Tagetes erecta* L.) při zvýšené koncentraci  $O_3$  (o 60 ppb a 120 ppb) pozorováno, že ozón do listů proudí průduchy více při vyšší koncentraci  $O_3$  ve vzduchu, než při koncentraci nižší. Zvýšení toku však přisuzovali autoři spíše strmějšímu gradientu koncentrace mezi vnitřním a vnějším prostředím listu, což podporuje rychlost difúze do listu, než změně vodivosti průduchů, která byla snižena. Podobné výsledky byly pozorovány např. i u listů vrby (Pääkkönen et al., 1996) nebo dubu (Calatayud et al., 2011b).

Zavírání průduchů je regulováno draselnými ionty, jejichž koncentrace se ve svěracích buňkách snižuje. Toto snížení je způsobeno inhibicí kanálů, kterými draselné ionty vtékají do buněk (Torsethaugen et al., 1999). Rozdílnými koncentracemi draselných iontů dochází k uzavření průduchů a nižší vodivosti. Zároveň tímto mechanismem dochází k omezení rychlosti čisté fotosyntézy; toto omezení bylo pozorováno v různých studiích (Hoshika et al., 2014; Yang et al., 2017b), ačkoliv zavření průduchů pravděpodobně není vysvětlen veškerý pokles ve fotosyntéze (Zhang et al., 2014b).

Změna ve vodivosti průduchů po vystavení  $O_3$  je ovlivněna i stářím listů. Ve studii provedené na listech břízy byl pozorován vyšší tok ozónu do listů, které se začaly vyvíjet před začátkem expozice, a do listů plně vyvinutých, zatímco tok ozónu do listů, které se začaly vyvíjet v průběhu expozice, byl nižší než u prvních dvou skupin. Měření na listech se v této studii provádělo při dvou dávkách ozónu, jedna byla vysoká 70 ppb, druhá 130 ppb. Zvýšené proudění  $O_3$  do listu bylo pozorováno jen u rostlin vystavených nižším dávkám ozónu, při vyšších dávkách nebyla vodivost průduchů průkazně ovlivněna (Pääkkönen et al., 1996).

U listů břízy, které začínaly růst a dále se vyvíjely pod vlivem ozónu, byla pozorována vyšší hustota a nižší vodivost průduchů oproti kontrolním rostlinám. Tato vyšší hustota průduchů pravděpodobně napomáhá rozložit množství ozónu pronikajícího do vnitřních struktur listu a na jeden průduch tak připadne mnohem nižší výměna plynů (Pääkkönen et al., 1996). Tento jev se dá nejlépe vysvětlit jako přizpůsobení nových listů na všeobecně zvýšené dávky ozónu ve vzduchu.

### Reakce ozónu s buněčnou stěnou

Většina mně dostupné literatury se zabývá především proniknutím ozónu do struktur listu přes průduchy. <sup>3.1.2.</sup> O<sub>3</sub> je však vystavena celá pokožka rostliny a s jeho působením se setkávají kromě buněk svěřacích i další pokožkové buňky listu, které ve vstupu O<sub>3</sub> do struktur listu mohou hrát též roli. Na rozdíl od průduchů, které jsou přizpůsobeny průchodu plynů do vnitřních struktur listu, je však pokožka kompaktnější a průchod O<sub>3</sub> do vnitřních struktur listu by byl zapříčiněn případným poškozením pokožky. Na několika víceletých dřevinách byly popsány viditelné nekrózy na listech a poškození v mezofylu, která byla sledována pod těmito nekrotickými skvrnami, byla výraznější, než v buňkách okolo (Bussotti et al., 2005).

Princip tohoto poškození na úrovni buněk začíná u buněčné stěny, která je zároveň první strukturou, se kterou se O<sub>3</sub> při svém působení setkává. Buněčná stěna (BS) slouží jako mechanická opora buňky, její odpověď na zvýšené množství ozónu spočívá v ukládání různého chemického materiálu a celkového tloušťnutí, které zvyšuje mechanickou odolnost buňky a napomáhá při detoxifikačních procesech (Bussotti et al., 2005). Zároveň byl po vystavení O<sub>3</sub> u topolu a břízy pozorován zvýšený obsah antioxidantů, fenolických látek, proteinů a lipidů v buněčné stěně, díky kterým je pravděpodobnost, že se ozón přes buněčnou stěnu do vnitřních struktur listu dostává, poměrně snížena (Oksanen et al., 2004a). Tuto hypotézu podporuje studie, ve které po vystavení břízy a topolu ozónu byl detekován na vnějším hydrofobním povrchu buněčné stěny u mezibuněčných prostorů peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), což může dokazovat, že se ozón rozkládá ještě před tím, než dosáhne plazmatické membrány a buněčnou stěnou tedy není schopen prostoupit (Oksanen et al., 2004a).

### 3.2. Signalizace

Odpověď rostliny na zvýšenou koncentraci ozónu má za cíl zamezit poškození, které by O<sub>3</sub> mohl rostlině způsobit. Odpověď je zprostředkována kupříkladu fytohormony, především kyselinou abscisovou (ABA), ale také kyselinou jasmínovou (JA) a salicylovou

(SA) nebo etylénem (ET) (Cotrozzi et al., 2017). Tyto fytohormony podle zvyšující se koncentrace ozónu mění svou koncentraci v pletivech rostliny a těmito změnami můžou vyvolat např. zavření průduchů (tento účinek má v listech na průduchy ABA) (McAdam et al., 2017). Na zvýšenou koncentraci O<sub>3</sub> také odpovídají ionty, jejichž koncentrace se též mění (Evans et al., 2005a), a iontové kanály, které se otevírají nebo zavírají, a tímto mechanismem je ovlivňován tok iontů do buněk (Torsethaugen et al., 1999).

### Změny koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů

Za hlavní signální molekulu zprostředkovávající odpověď rostlinné buňky na široké spektrum stresů je považován vápenatý kationt (Ca<sup>2+</sup>). Na zvýšenou koncentraci ozónu odpovídá Ca<sup>2+</sup> zvyšující se cytosolickou koncentrací, která se objevuje během prvních sekund až minut v signálních kaskádách (Vaultier and Jolivet, 2015). Pozorované zvýšení cytosolické koncentrace vápenatých iontů se objevuje dříve při ošetření vyššími dávkami O<sub>3</sub> (Evans et al., 2005b). Toto pozorování můžeme vysvětlit tak, že nejdříve se zformují ROS nebiologického původu (rozklad O<sub>3</sub>) a vyvolají vtok Ca<sup>2+</sup> iontů do cytosolu, které jsou důležité pro aktivaci aniontových kanálů. Inhibice aniontových kanálů vede k depolarizaci plazmatické membrány a v extrémním případě k buněčné smrti (Kadono et al., 2010).

#### 3.2.2. Fytohormony

Fytohormony hrají důležitou roli v odpovědi rostlin na různé stresy (např. vodní stres), napomáhají obraně rostlin a jejich detoxifikaci včetně reakce na ozón. Prvním fytohormonem, který se účastní reakce rostliny na zvýšenou koncentraci ozónu, je ABA. Její zvýšené množství se podílí na zavírání průduchů a tedy nepřímo i na zamezení vstupu ozónu do listu.

Na rostlinách huseníčku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) a rajčete (*Solanum lycopersicon* Mill.) byl pozorován nárůst koncentrace ABA při vyšší koncentraci ROS v listu. ABA je primárním spouštěčem zavírání průduchů, zvýšení její hladiny vedlo k indukci uzavírání průduchů v pozorovaných rostlinách (McAdam et al., 2017). Produkce ABA se však netýká jen svěracích buněk průduchů, její produkce může být vyššími koncentracemi ROS indukována ve všech pletivech listu (McAdam et al., 2017).

Dalším důležitým fytohormonem hrajícím roli v signalizaci a ochraně rostliny je JA, jejíž koncentrace v listu se pod vlivem ozónu také mění. Dle studie provedené na aksamitníku koncentrace JA v listech pod vlivem ozónu klesá a tento pokles může být jednou z příčin poranění buňky, potažmo její smrti (Yang et al., 2017a). Naopak na rostlinách huseníčku byl



po začátku expozice pozorován velký nárůst obsahu JA v listech, po hodině expozice však hladina začala klesat. Po osmi hodinách expozice se koncentrace JA opět mírně zvedla, poté však opět začala klesat a její hladina klesla na nižší koncentraci než před začátkem expozice (Cotrozzi et al., 2017). Tato dvě pozorování by spolu mohla souhlasit v tom, že v závěru hladina JA v listech pozorovaných rostlin poklesla, avšak u aksamitníku nebyl průběh zvyšování či snižování koncentrace JA v listu zaznamenáván v průběhu expozice, jako u huseníčku, nedá se tedy s určitostí soudit, že hladina JA se u obou rostlin měnila stejně.

Jako další fytohormon podílející se na signalizaci bychom mohli uvést SA, která iniciuje tvorbu lézí. Změny v koncentraci SA po expozici ozónu jsou však závislé také na vodním stresu. Pokud se vodní stres zkombinuje s působením ozónu, chová se koncentrace SA v listech podobně jako koncentrace JA; na rozdíl od JA zůstala koncentrace SA po celou dobu ošetření ozónem vyšší než před začátkem expozice (Cotrozzi et al., 2017).

Stres u rostliny je často provázen vyšší senescencí listů. Při zvýšené koncentraci ozónu k senescenci listů dochází také. Dle pozorování na huseníčku senescence není podpořena zvýšenou koncentrací JA, ale koncentrací ET. Pod vlivem zvýšených koncentrací ozónu listy huseníčku emitovaly vyšší množství ET, než když rostlina rostla v běžných podmínkách. S delším časem expozice se množství produkovaného ET zvyšovalo, což poukazuje i na zvýšenou senescenci listů (Cotrozzi et al., 2017).

### 3.3. Detoxifikace listu, poškození a opravné systémy

Poté, co molekuly  $O_3$  vstoupí do listového mezofylu, následuje systémová odpověď, specifická pro různé druhy rostlin. Některé rostliny jsou vůči ozónu citlivější, kupříkladu opadavé stromy v porovnání se stromy stálezelenými (Calatayud et al., 2011b), nebo dokonce i různé kultivary jednoho druhu rostliny (Dai et al., 2017). U všech rostlin však dochází k reakcím, které mají za účel  $O_3$  degradovat na méně reaktivní molekuly. Pokud je však oxidativní stres příliš silný, dochází k degradaci membrán projevující se zvýšením hladiny MDA v listech a posléze poraněním buněčných organel, snížení rychlosti čisté fotosyntézy (Hoshika et al., 2014; Paoletti et al.; Yang et al., 2017a; Zhang et al., 2014a) a v závěru ke kolapsu buňky. Dále dochází v buňkách k akumulaci ROS a díky jejich vysoké reaktivitě působí změny v buněčné struktuře, kupříkladu zmenšení chloroplastů, ztenčení nebo naopak ztloustnutí buněčných stěn (Oksanen et al., 2004b).

## Sekundární působení ozónu v buňkách

V druhotném působení ozónu na rostlinné buňky hrají důležitou roli reaktivní formy kyslíku, ve které se ozón svými reakcemi s buněčnými složkami přeměňuje. Zformované ROS reagují s komponenty buněčné stěny i plazmatické membrány (Pellinen et al., 1999), jsou schopné plazmatickou membránu štěpit a procházet skrz ni do buňky. V plazmalemě se tak tvoří oxidativní praskliny a např. peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) je schopný tudý proniknout do lumen buňky k blízkým chloroplastům (Oksanen et al., 2004a).

Kromě narušení buněčné stěny a plazmatické membrány se  $\text{O}_3$  podílí také na dalších poškozeních buňky. Jako dobrý ukazatel oxidativního stresu v buňce slouží MDA, který se v buňkách během působení stresu akumuluje (Del Rio et al., 2005). V buněčných membránách buněk listu dochází působením  $\text{O}_3$  ke zvýšené peroxidaci lipidů a mastných kyselin a zároveň se zvyšuje množství MDA (Dai et al., 2017; Yang et al., 2017a). Dle pokusů na rýži (*Oryza sativa* L.), se však toto zvýšení projevilo až ke konci období, kdy byly rostliny ošetřeny ozónem vystaveny, což může ukazovat, že zvýšená hladina MDA v listech nemusí být způsobena ozónem přímo, ale jako důsledek metabolických procesů (Ueda et al., 2013).

Ve studii ((Pellinen et al., 1999)) zabývající se proniknutím  $\text{H}_2\text{O}_2$  do buňky bylo pozorováno, že peroxid vodíku nejdříve penetruje přes buněčnou stěnu a plazmatickou membránu a až po několika hodinách se rozptýlí v cytoplazmě. Rozpuštěný  $\text{H}_2\text{O}_2$  se v buňce akumuluje ve dvou fázích, nejdříve v buněčné stěně a plazmatické membráně, odkud se přesouvá do mitochondrií a peroxizomů, kde dochází k jeho akumulaci nejvíce (pravděpodobně díky vlastní produkci  $\text{H}_2\text{O}_2$  těchto organel). Vzhledem k povaze peroxizomů by tato akumulace mohla také poukazovat na detoxifikační procesy, které v nich probíhají. Akumulace  $\text{H}_2\text{O}_2$  v mitochondriích by však tuto teorii vyvracela, protože akumulace  $\text{H}_2\text{O}_2$  způsobuje jejich poškození. Tato poškození budou podrobněji rozebrána v následujících kapitolách.

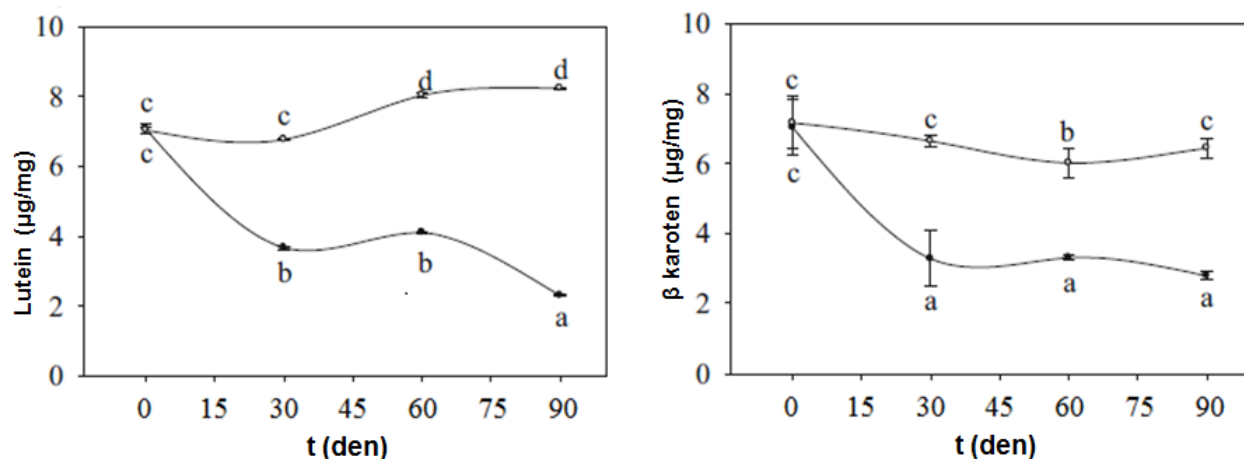
Kromě vlastního poškození můžou ROS sloužit jako signální molekuly, což dokazuje např. pozorování (Kadono et al., 2010), kdy molekuly  $\text{O}_2^{2-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  sloužily jako signální molekuly podílející se na snížení inhibice aniontových kanálů, jak je již zmíněno v předchozí kapitole.

## Působení antioxidantů

Působení antioxidantů pomáhá degradovat reaktivní formy kyslíku a detoxifikovat tak rostlinu pokud možno ještě dříve, než dojde k vážnému poškození. Při oxidativním stresu by se tedy měla hladina antioxidantů zvyšovat. Oproti očekávání (Zhang et al., 2012) ve své studii pozoroval, že ačkoli celková antioxidační kapacita sledovaných rostlin (*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg., *Liquidambar formosana* Hance, *Ilex integra* Thunb., *Photinia x fraseri*, *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl, *Cyclobalanopsis glauca* Thunb., *Neolitsea sericea* Koidz., *Schima superba* Gardner & Champion) je pod vlivem O<sub>3</sub> snižena, obsah MDA se zvýšil, z čehož se dá usuzovat, že hladina antioxidační kapacity hraje důležitou roli ve schopnosti detoxifikovat rostlinný organismus a v jeho citlivosti vůči O<sub>3</sub>.

Jedním z antioxidačních činidel, které rostliny v listu syntetizují, je AsA. Při vystavení rostlin působení O<sub>3</sub> můžeme jako stresovou odpověď pozorovat různé změny koncentrace AsA. Očekávanou odpovědí v množství AsA na zvýšenou koncentraci O<sub>3</sub> a ROS v listu bylo zvýšení syntézy AsA a vyrušení redoxního stavu v listu. (Yang et al., 2017a) ve svých pokusech na aksamitníku potvrdil, že díky působení O<sub>3</sub> dochází v listech k intenzivnější syntéze AsA a její celkový obsah vzrostl. Naopak u broskvoně bylo zjištěno, že se obsah AsA po ošetření ozónem signifikantně snížil. I přes toto snížení obsahu AsA se však v listech broskvoně zvýšila celková antioxidační kapacita díky navýšení aktivity antioxidačních enzymů, konkrétně katalázy, askorbátperoxidázy a superoxiddismutázy (Dai et al., 2017). Tato nerovnováha mezi neenzymatickými antioxidanty a antioxidačními enzymy, vyvolaná detoxifikací ozónu se může dle autorů negativně projevit např. na produktivitě v dalších obdobích (Dai et al., 2017).

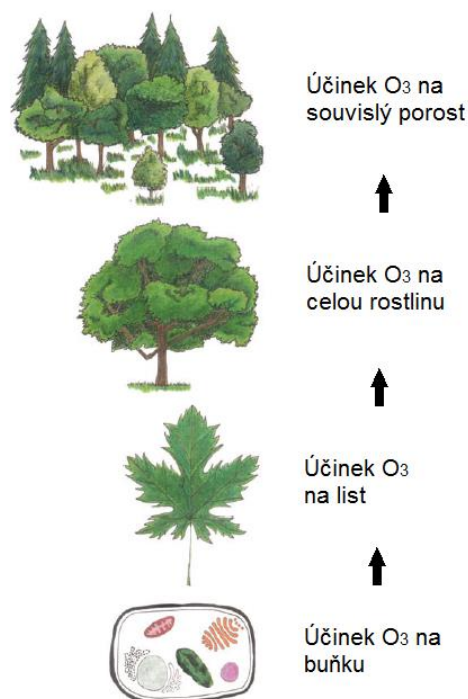
Důsledkem působení ozónu se také snižuje v listech obsah karotenoidů, což jsou další látky s antioxidačními účinky (Dai et al., 2017). Např. při pozorování listů šalvěje vystavené vyšším dávkám O<sub>3</sub> bylo zjištěno, že byla snížena koncentrace β karotenu a luteinu (Obrázek 4) (Pellegrini et al., 2015b), což jsou karotenoidy hrající úlohu v rostlinné detoxifikaci a jejich snížená koncentrace může poukazovat na nižší obranyschopnost rostliny.



Obrázek 4 – Grafy zachycující snížený karotenoidů v listech *S. officinalis*. Prázdné značky (horní křivka) znázorňují kontrolní rostliny, vyplněné značky (dolní křivka) označují rostliny ošetřené ozónem. Převzato a upraveno podle (Pellegrini et al., 2015a)

#### 4. Změny ve struktuře listu vyvolané působením ozónu

Zvýšená koncentrace  $O_3$  se projevuje na listech různými způsoby. Jinak působí na listy mladé a vyvíjející se, jinak působí na listy již plně rozvinuté (Pääkkönen et al., 1996). Byť jsou účinky  $O_3$  na listy mezi bylinami a dřevinami většinou velmi podobné, může docházet k menším odchylkám ve způsobu a intenzitě poškození ovlivněným výškou umístění listu v prostoru nebo hustotou olistění. V několika studiích bylo popsáno, že vliv ozónu je různý v závislosti na umístění listu na větvi a také umístění větve v koruně stromu (Novak et al., 2005; Samuelson and Edwards, 1993; Zhang et al., 2014b).



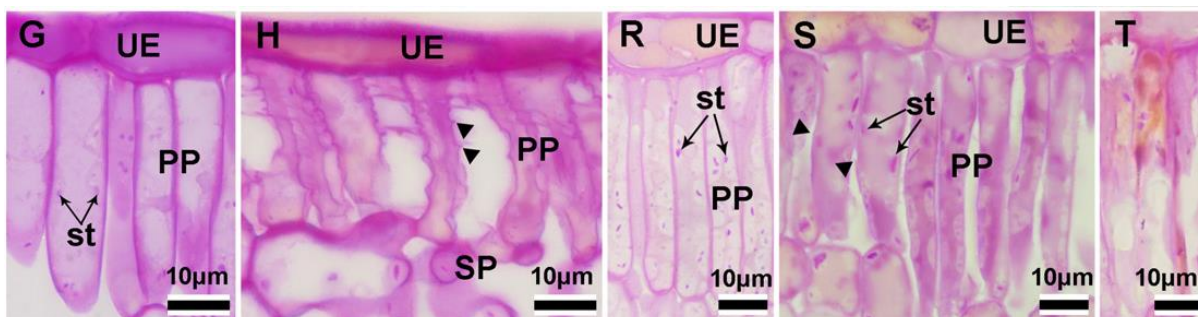
Ozón proniká do struktury listu, kde dále reaguje za vzniku ROS, jak již bylo popsáno v předchozí kapitole. Všechny zmíněné reakce vedou k detoxifikaci, aklimaci nebo poškození listů. Toto poškození začíná nejdříve na buněčné úrovni (Obrázek 5), dochází k narušení buněčného

Obrázek 5 – schéma působení ozónu. Ozón působí na orgány v buňce, což se promítá na celém listu. Stav listů působí na celkovou kondici rostliny a celková kondice rostlin se odráží na stavu souvislého porostu. Převzato a upraveno podle (Ainsworth et al., 2012)

obsahu. Pod mikroskopem je často pozorovatelná kondenzace a deformace organel (např. vakuola, chloroplasty nebo mitochondrie, podrobněji budou tyto změny popsány v následující kapitole), zároveň také dochází k adaxiální kumulaci oxidovaných proanthokyanidinových sraženin (Moura et al., 2018). Tato poškození se pak dále projevují na anatomické struktuře listu, protože však listy nejsou uniformní a většina literatury použité v této práci se týká rostlin s bifaciálními listy s dobře odlišitelným palisádovým a houbovitým parenchymem, je v následujících podkapitolách popsáno i odlišné působení ozónu na jednotlivé mezofylové vrstvy.

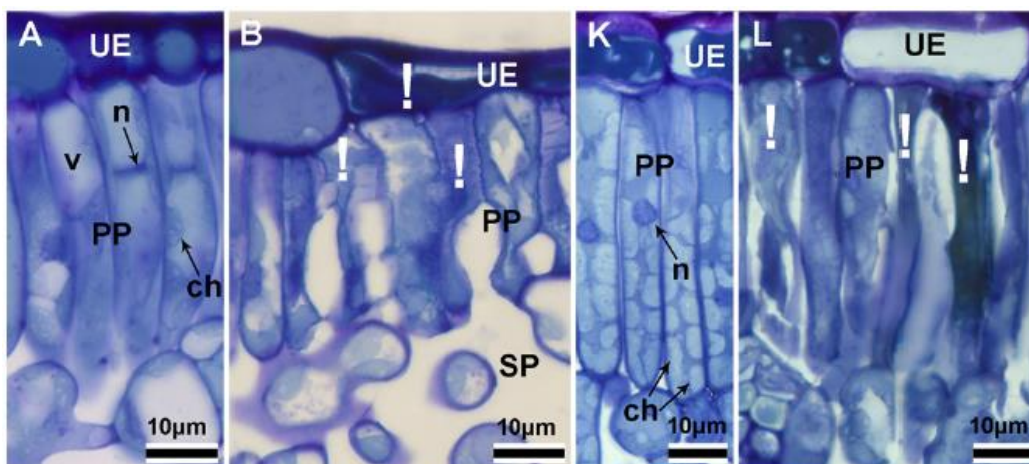
#### 4.1. Změny na buněčné úrovni

Pod vlivem zvýšené koncentrace  $O_3$  se často tvoří záhyby na buňkách (Obrázek 6), různé lokální tloušťnutí a výstupky v buněčné stěně. Dále  $O_3$  způsobuje narušení chloroplastů, kondenzaci chromatinu, otékání mitochondrií, hromadění sekundárních metabolitů ve vakuole a zvýšení počtu peroxizomů (Alves et al., 2016).



Obrázek 6 – Buňky palisádového parenchymu (PP) kontrolních rostlin (G, R) a buňky palisádového parenchymu (PP) a houbovitého parenchymu (SP) rostlin *P. gonoacantha* ošetřených ozónem se záhyby a výstupky na buněčných stěnách (H, S, T). V buňkách jsou patrná škrobová zrna (st). Převzato a upraveno podle (Moura et al., 2018).

Pokud ozón působí na list delší dobu, dochází postupně ke kolapsu buněk, cytorrhize, desintegraci a buněčné smrti. Cytorrhizované buňky mají narušený buněčný obsah, poškozené membrány, pyknotické jádro (jádro s nevratně kondenzovaným chromatinem) a můžeme u nich pozorovat částečně degradované zbytky buněčného obsahu a proteinového obsahu (Obrázek 7) (Moura et al., 2018).



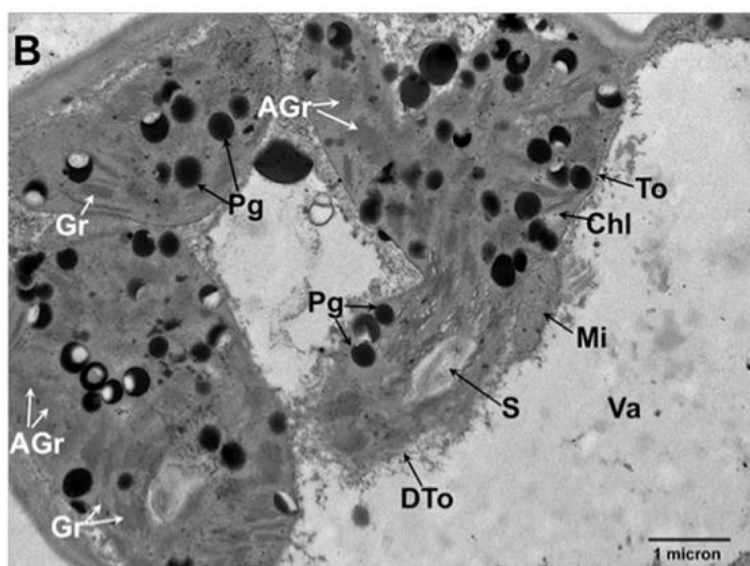
Obrázek 7 – Pozorování houbovitého parenchymu (SP), palisádové parenchymu (PP) a adaxiální pokožky (UE) *P. gonoacantha*. V pletivech jsou patrné nekrotické buňky (!), jádra (n), chloroplasty (ch) a vakuoly (v). Převzato a upraveno podle (Moura et al., 2018).

### Změny v chloroplastech

4.1.1. Chloroplasty jsou působením  $O_3$  vysoce postiženy – dochází k redukci obsahu chlorofylu vedoucí k následnému snížení rychlosti čisté fotosyntézy (Dai et al., 2017; Hoshika et al., 2014; Paoletti et al.; Pellegrini et al., 2015b; Yang et al., 2017a; Zhang et al., 2012, 2014b; Zouzoulas et al., 2009). Ne všechny listy jedné rostliny jsou však  $O_3$  poškozeny ve stejném rozsahu. Míra poškození je jak druhově specifická, tak závisí na fenologické fázi listu. Důkaz, že starší listy reagují na zvýšenou koncentraci  $O_3$  jinak než mladé listy, můžeme pozorovat na sazenicích břízy bělokoré (*Betula pendula* Roth), které byly rozděleny podle stáří listů na tři skupiny – první s plně rozvinutými listy, druhou s listy právě se rozvíjejícími a třetí, u níž pupeny teprve rašily a listy se vyvíjely pod vlivem ozónu po celou dobu svého růstu. Po ošetření ozónem se u všech tří skupin objevovaly abnormální a sférické tvary chloroplastů se sníženým množstvím škrobu a hustším stromatem, přičemž u druhé a třetí skupiny se chloroplasty zkrátily a především u třetí skupiny došlo k zúžení chloroplastů (Pääkkönen et al., 1996). Hustší stroma chloroplastů bylo také po působení vyšší koncentrací  $O_3$  objeveno v buňkách listů u sazenic jasanu zimnáře (*Fraxinus ornus* L.), chloroplasty byly celkově menší a jejich množství bylo oproti kontrolním rostlinám nižší (Paoletti et al., 2010).

Ačkoliv bylo u břízy sledováno nižší množství škrobu, podle jiných pozorování je patrné, že se škrobová zrna hromadí v buňkách listů vystavených zvýšené koncentraci  $O_3$  v ovzduší více než v buňkách listů, které ozónu nejsou tolik vystavené. V chloroplastech svěracích buněk jasanu zimnáře se škrobová zrna začala objevovat, a jejich velikost byla nejvíc zvýšena u rostlin ošetřených  $O_3$ , oproti rostlinám rostoucím v kontrolních podmínkách,

kde byly tyto změny mnohem menší. V mezofylu ležícím nad takto poškozenými svěřacími buňkami se objevila strukturální poškození, která však nesouvisela s průduchovými buňkami s akumulovaným škrobem lokalizovanými v pokožce pod těmito buňkami (Paoletti et al., 2010). U pajasanu žláznatého (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle), jasanu čínského (*Fraxinus chinensis* Roxb.), platanu východního (*Platanus orientalis* L.) a tnovníku akátu (*Robinia pseudoacacia* L.) se po ošetření O<sub>3</sub> množství škrobových zrn v chloroplastech též zvýšilo, začaly se v nich také objevovat plastoglobuly a lipid-proteinová tělíska a nakonec v chloroplastech těchto listů došlo k částečnému i úplnému porušení thylakoidních membrán (Obrázek 8) (Gao et al., 2016b).



Obrázek 8 – Detail buňky *R. pseudoacacia* s poškozenými chloroplasty (Chl) se škrobovými zrny (S), obsahující množství plastoglobulů (Pg) a dezintegrovaných gran (Agr). Tonoplast (To) vakuol (Va) je na mnoha místech rozložený (DTo). Dále jsou vidět i mitochondrie (Mi). Převzato a upraveno podle (Paoletti et al., 2010)

I u jasanu zimnáře se v chloroplastech rostlin ošetřených O<sub>3</sub> začaly akumulovat plastoglobuly, což poukazuje na degradační procesy, které v listech začaly probíhat (Paoletti et al., 2010). Chloroplasty břízy bělokoré pod vlivem O<sub>3</sub> více bobtnaly a také se v nich zvyšoval počet plastoglobulů, přičemž u rostlin s listy plně vyvinutými byl počet plastoglobulů nejvyšší. Thylakoidy rostlin ošetřených O<sub>3</sub> byly častěji více zvlněné než thylakoidy kontrolních rostlin. (Pääkkönen et al., 1996).

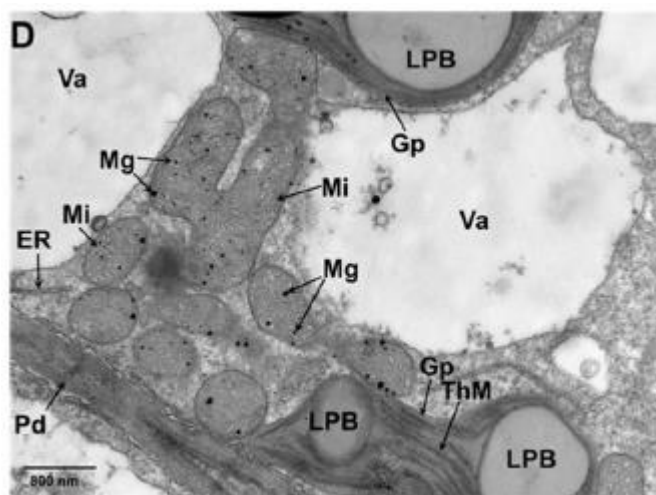
Velmi podobné výsledky uvádí i recentní studie na brazilských stromech *Astronium graveolens* Jacq., *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F.Macbr. a *Croton floribundus* Spreng., u kterých byla pozorována kondenzace obsahu chloroplastů, poškození thylakoidní membrány a vyšší hustota plastoglobulů (Moura et al., 2018). Všeobecně je možno z pozorovaných výsledků dostupné literatury usuzovat, že ozón působí na chloroplasty všech rostlin zhruba



stejnými účinky – dochází k porušení thylakoidních membrán, hromadění plastoglobulů a zahuštění stromatu. Zároveň je také možno z literatury potvrdit, že listy, které již byly plně vyvinuté, nebo v určité pokročilejší fázi vývoje, poškodil  $O_3$  více než listy, které se začaly vyvíjet v průběhu období, kdy na ně zvýšený  $O_3$  působil. V tomto případě se pravděpodobně jedná o aklimatizaci, která se v počátku vývoje listů objevila, ale kterou si ostatní listy, jejichž vývoj začal před zvýšením ozónu v ovzduší, nedokázaly vytvořit (Pääkkönen et al., 1996).

### Změny v mitochondriích

Další ozónem ovlivněnou organelou jsou mitochondrie. Protože v metabolismu buňky hrají také důležitou roli nejen v získávání energie štěpením uhlíkatých sloučenin, ale také ochranou buňky před kyslíkovými radikály, dalo by se usuzovat, že na střet s  $O_3$  budou lépe přizpůsobené než ostatní organely a poškození u nich budou výrazně menší než u chloroplastů. Byť je jejich primární funkcí interakce s  $O_2$  a potažmo i s ROS,  $O_3$  v jejich struktuře působí též negativní změny. Se zvyšujícím se množstvím ozónu docházelo u břízy k desintegraci mitochondriální matrix a krist, docházelo také ke zvýšení množství cytoplasmatických lipidů (Pääkkönen et al., 1996). I u rostlin pajasanu žláznatého, jasanu čínského, platanu východního a trnovníku akátu docházelo v mitochondriích k akumulaci lipidových kapének, které se podobaly plastoglobulům (Obrázek 9), což bylo u pajasanu žláznatého nejvýraznější (Gao et al., 2016b).



Obrázek 9 – Detail buňky listu *A. altissima* s několika mitochondriemi (Mi) obsahujícími mitoglobuly (Mg); gerontoplasty (Gp) s thylakoidními membránami (ThM) obsahujícími lipid-proteinová tělíska (LPB); vakuolami (Va), zasahujícím endoplazmatickým retikulem (ER) a pektinovými kapkami (Pd). Převzato a upraveno podle (Gao et al., 2016a)



Mitochondrie jsou zároveň orgány, v nichž se akumulují produkty vzniklé po degradaci  $O_3$  – ROS což je pro mitochondrie dosti závažným problémem, při vyšší akumulaci akumulaci ROS dochází nejdříve k rozpadu krist a poté k desintegraci mitochondriální matrix (Pellinen et al., 1999).

### Změny v peroxizomech

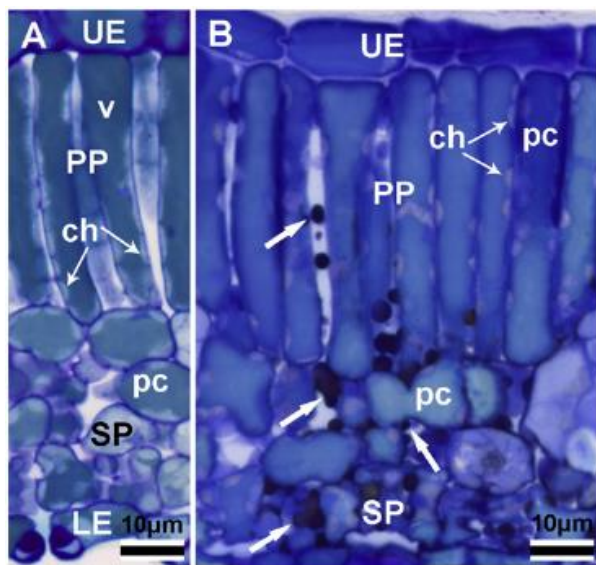
Peroxisomy hrají významnou roli v detoxifikaci buňky a při zvýšené koncentraci  $O_3$  se v nich akumulují sekundární produkty jeho působení, především  $H_2O_2$ . Ten se v peroxizomech hromadí i při běžném rostlinném metabolismu (fotorespirace, beta-oxidace mastných kyselin, glyoxylátový cyklus a detoxifikace ROS vzniklých jiným způsobem než v reakci na  $O_3$ ), při zvýšené koncentraci  $O_3$  ve vzduchu však dochází k vyšší produkci peroxidu vodíku (Oksanen et al., 2004b).

Ačkoli peroxizomy hrají důležitou roli v detoxifikaci a tudíž by měly být vůči ROS odolnější než ostatní orgány, dochází ke zvýšení jejich počtu, zejména u rostlin méně citlivých k působení ozónu (Oksanen et al., 2004b), a změně v jejich struktuře.

### Změny ve vakuole

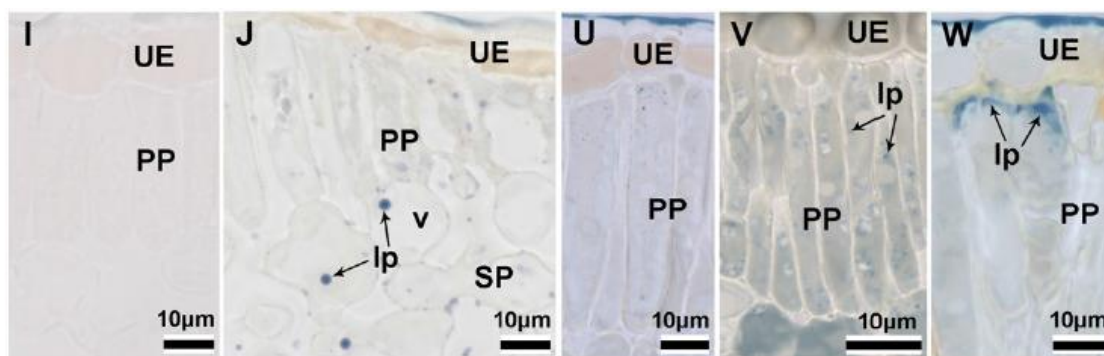
#### 4.1.4.

Po vystavení jasanu zimnáře působení  $O_3$ , bylo pozorováno plnění vakuoly produkty sekundárního metabolismu (Paoletti et al., 2010). Velmi často pozorovaným jevem je akumulace taninů (Gao et al., 2016b; Moura et al., 2018) a polysacharidových slizovitých substancí do vakuoly (Obrázek 10) (Moura et al., 2018).



Obrázek 10 – detail abaxiální epidermis (LE), houbového parenchymu (SP), palisádového parenchymu (PP) a adaxiální epidermis (UE) u rostlin *A. graveolens* vystavených ambientnímu venkovnímu ozónu (B) a u kontrolních rostlin *A. graveolens* (A). Na detailech jsou patrné nahromaděné proanthokyanidiny (pc), vakuoly (v). Dále jsou patrné chloroplasty (ch) a mezibuněčné prostory (označené šipkou). Převzato a upraveno podle (Moura et al., 2018).

Vakuoly mezofylových buněk platanu východního obsahují přirozeně vysoké množství taninů a při působení vysokých koncentrací  $O_3$ , kdy se ve vakuolách taniny běžně akumulují, se tyto taniny ve vakuole běžně obsažené koagulují. Nakonec, po nějaké době, kdy  $O_3$  na list působil, tonoplast praskal a buňky ztrácely turgor (Gao et al., 2016b). Před buněčnou smrtí ve vakuole také docházelo k akumulaci lipidů (Obrázek 11) a zvýšené oxidaci proanthokyanidinů (Moura et al., 2018). Je známo, že  $O_3$  reaguje s membránovými lipidy a působí jejich peroxidaci (Moura et al., 2018; Yang et al., 2017b). Díky této peroxidaci nedochází nejen k prasknutí tonoplastu a vylití vakuolárního obsahu, porušená membrána vakuoly může být rozkládána a účinek tohoto mechanismu je stejný, jako při zvýšeném ukládání sekundárních metabolitů uvnitř vakuoly.

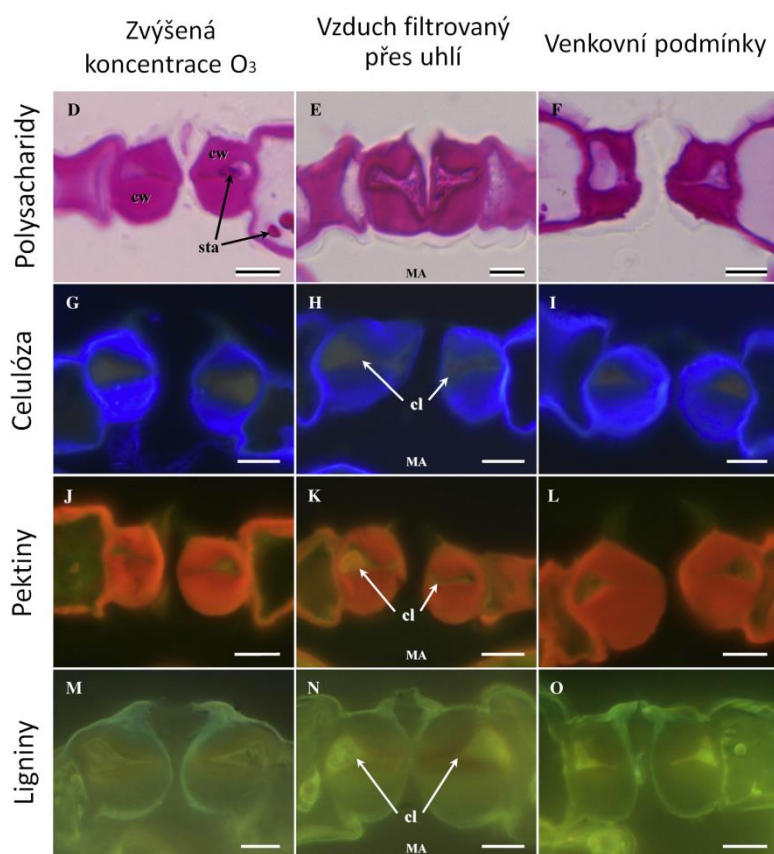


Obrázek 11 – Detaily houbovitého parenchymu (SP), palisádového parenchymu (PP) a adaxiální epidermis (UE). Na detailu J puntíky ukazují akumulaci lipidů (lp) a vakuoly (v). Detaily I a J zobrazují *P. gonoacantha* vystavený zvýšené koncentraci ozonu, detaily U, V a W zobrazují *P. gonoacantha* rostoucí ve venkovních podmínkách. Převzato a upraveno podle (Moura et al., 2018).

### Změny v buněčné stěně

Buněčná stěna (BS) tvoří mechanickou oporu buněk, proti vlivu  $O_3$  by měla být odolnější než buněčné kompartmenty. Na úrovni mezofylu se však díky vlivu zvýšeného ozónu začaly v apoplastu objevovat bradavičnaté výstupky, které někdy dokonce vyplňovaly mezibuněčný prostor, a buněčné stěny začaly tloustnout, zatímco u kontrolních rostlin tyto změny chyběly (Moura et al., 2018; Paoletti et al., 2010). Ve ztlustlých buněčných stěnách byly pozorovány polysacharidy a pektiny, pektinové bradavičnaté výstupky často obsahovaly celulózu a materiál podobný ligninu (Obrázek 12). Tyto výstupky byly také nalezeny na vnitřních periklinálních buněčných stěnách epidermálních buněk na abaxiální straně listu jasanu. V buněčných stěnách listů jasanu ošetřeného ozónem však nebyly nalezeny flavonoidy ani kalóza (Paoletti et al., 2010). Naopak u pajasanu žláznatého a platanu

východního (Gao et al., 2016b) pomocí fluorescenční světelné a transmisní elektronové mikroskopie bylo pozorováno hromadění kalózy mezi buněčnou stěnou a plazmatickou membránou. Tloušťka BS je považována za aklimační proces, kdy ztlustlá BS usnadňuje detoxifikační procesy a buňce poskytuje vyšší mechanickou oporu, aby se zabránilo jejímu kolapsu (Bussotti Filippo et al., 2005). V případě tvorby bradavičnatých výstupků se však dá usuzovat, že se jedná o poškození buněčné stěny, kdy je zahájena tvorba tlustší buněčné stěny na ochranu buňky, depozice vyztužujících látek je však neusměrněná.



*Obrázek 12 – Detail svěřacích buněk na listech F. ornus ve zvýšené koncentraci ozonu, vzduchu filtrovaném přes uhlí a ve venkovních podmínkách. Na detailech jsou obarvené jednotlivé komponenty BS; poly-sacharidy (D-F), celulóza (G-I), pektiny (J-L) a ligniny (M-O). Málo patrné rozdíly ve tvaru buněk tloušťky BS nebo otevření průduchů je zaviněno pozicí a směrem řezu. Celulóza a ligniny jsou lokalizovány ve větším množství na vnější straně BS, pektiny byly lokalizovány více ve vnitřní BS. MA – mezofylový apo-plast; cl – buněčné lumen; cw – buněčná stěna; sta – škrob. Převzato a upraveno podle (Paoletti et al., 2010).*

U mezofylových buněk listů jasanu zimnáře vystaveného působení  $O_3$  byly sledovány ostré okraje buněčných stěn ukazující diskontinuitu s ostatními částmi buněčné stěny a dokazující tak lom buněčné stěny, ke kterému pod vlivem  $O_3$  u jasanu docházelo (Paoletti et al., 2010). Podobně jako u buněčné stěny docházelo k degradaci střední lamely ve studii (Gao et al., 2016b).

U svěřacích buněk jasanu zimnáře docházelo ke změnám v jejich tvaru a u jejich BS byla objevena různá tloušťka (Paoletti et al., 2010). U rostlin smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) H. Karst.) pod vlivem  $O_3$  docházelo ke ztenčení BS svěřacích i vedlejších buněk a ke

ztrátě absorpční kapacity světelného záření v důsledku ztráty enkrustujícího materiálu, který obsahoval lignin a ostatní látky (Maier-Maercker, 1989).

## 4.2. Změny na úrovni pletiva

Pod vlivem  $O_3$  dochází ke změnám uvnitř buňky, avšak také ke změnám na úrovni pletiva. Jako první se s  $O_3$  setkává pokožka listu, jejíž odpověď by měla být nejvýraznější, protože zároveň tato struktura slouží jako prvotní ochrana před vstupem  $O_3$  do listu. Dále se  $O_3$  setkává s mezofylem, ale také cévními svazky, které jsou v listech lokalizované. Vzhledem k odlišnosti jejich struktury od struktury mezofylu, bude pravděpodobně jejich odpověď rozdílná. Stejně tak se pravděpodobně budou lišit mezi sebou reakce na zvýšenou koncentraci  $O_3$  jednotlivé vrstvy mezofylu díky různým metabolickým procesům, jež se v jednotlivých vrstvách odehrává.

### Pokožka

4.2.1. Pokožka odpovídá na vyšší koncentraci  $O_3$  různými změnami. Jedním z možných poškození epidermis je změna její tloušťky. Abaxiální epidermis listu různých kultivarů broskvoně pod vlivem  $O_3$  svoji tloušťku snižovala (Dai et al., 2017). Některé z pokožkových buněk (např. u pajasanu a trnovníku) pod vlivem  $O_3$  zkolabovaly (Gao et al., 2016b). Další možnou reakcí pozorovanou u bavlníku je zvýšení počtu epidermálních buněk (Zouzoulas et al., 2009), což může znamenat, že epidermální buňky jsou menší, než v listu rostliny rostoucí v čistém vzduchu.

Hustotu průduchů nemusí zvýšená koncentrace  $O_3$  nutně ovlivňovat – dle výsledků studie (Hoshika et al., 2014) zvýšené množství  $O_3$  hustotu průduchů u zkoumaných rostlin (*Ailanthus altissima*, *Fraxinus chinensis* Roxb. a *Platanus orientalis*) nezměnilo. Naopak podle výsledků (Pääkkönen et al., 1996) u břízy (*Betula pendula*) se po ošetření  $O_3$  hustota průduchů zvýšila. Tento výsledek však může být částečně vysvětlen celkovým zmenšením plochy listu. Podobné výsledky byly získány při zkoumání bavlníku (*Gossypium hirsutum* L.), kde se průduchy nachází na obou stranách listu. Na abaxiální straně se však jejich hustota zvýšila třikrát méně než na straně adaxiální (Zouzoulas et al., 2009). Bohužel, ve studii se nenachází vysvětlení, proč na adaxiální straně došlo k o tolik výraznějšímu zvýšení hustoty průduchů, než na straně abaxiální.

U bavlníku vystavených  $O_3$  se také měnily počty krycích trichomů vedoucích mezi hlavními cévami listů. Na abaxiální straně listu se počet trichomů snížil, zatímco

na adaxiální se zvýšil (Zouzoulas et al., 2009). Dle těchto výsledků je možné vyvozovat, že abaxiální strana listu reaguje na zvýšenou koncentraci  $O_3$  ve vzduchu odlišně od adaxiální strany listu. Avšak ve studii prováděné na liliovníku (*Liriodendron chinense*), ambronii (*Liquidambar formosana*) a astronii (*Astronium graveolens*), byla první makroskopická poranění zaznamenána právě na adaxiální straně listů (Moura et al., 2018; Zhang et al., 2012).

### Mezofyl a cévní svazky

Po delší expozici  $O_3$  docházelo u studovaných opadavých čínských dřevin (především u stromu *Ailanthus altissima*) ke kolapsu buněk a tudíž ke zvětšení mezibuněčných prostorů (Gao et al., <sup>4.2.2.</sup>2016b). U listů např. jasanu zimnáře se buňky mezofylu hroutí a zdravé buňky, nebo buňky méně poškozené, se více roztahují a vyplňují tak vzniklé prostory po buňkách, které vlivem  $O_3$  odumřely (Paoletti et al., 2010).

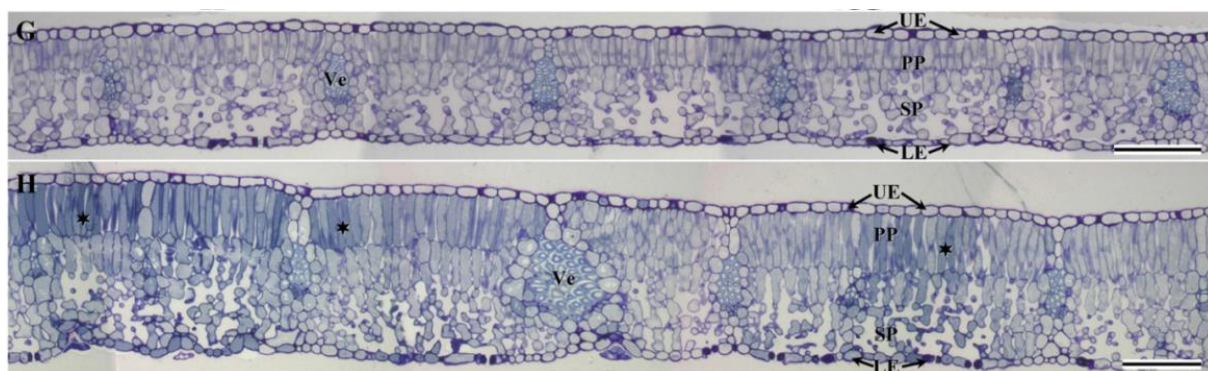
Poškození  $O_3$  se mnohdy výrazně liší mezi houbovým a palisádovým parenchymem. Byť se houbovitý parenchym nachází ve vrstvě hypostomatálního listu blíže abaxiální straně a tudíž i průduchům, kterými  $O_3$  do listu proniká, častěji jsou pozorovány změny v parenchymu palisádovém, který se nachází ve vrstvě bližší k adaxiální straně listu. Obzvláště v části palisádového parenchymu blíže k povrchu listu byly u tří brazilských dřevin pozorovány skupiny nekrotických, cytorrhizovaných a narušených buněk a tato poškození dosahovala až k vrstvám abaxiální epidermis (Moura et al., 2018). S největší pravděpodobností jsou tyto častější změny zaviněny faktem, že v palisádovém parenchymu probíhají ve větší míře metabolické procesy, zároveň je také palisádový parenchym strukturně mnohem kompaktnější než parenchym houbovitý.

Častým projevem poškození  $O_3$  je změna tloušťky mezofylu nebo poměru mezi houbovým a palisádovým parenchymem; u rostlin citlivých vůči oxidativnímu poškození vyvolanému působením  $O_3$  byl obvykle sledován nejnižší poměr mezi palisádovým a houbovým parenchymem, někteří autoři navrhují použít tento poměr jako indikátor poškození listu  $O_3$  (Oksanen et al., 2004b).

Ne na všech rostlinách se však oxidativní stres na tloušťce palisádového parenchymu projeví. Např. u broskvoně zvýšené množství  $O_3$  tloušťku palisádového parenchymu nesnížilo (Dai et al., 2017). U jasanu naopak byla poškození palisádového parenchymu větší než u parenchymu houbovitého. V listech se na úrovni palisádového parenchymu začaly vakuoly buněk plnit sekundárními metabolity, což bylo ve studii (Paoletti et al., 2010) detekováno díky obarvení buněk toluidinem O. Barvivo způsobilo zmodrání poškozených buněk více než



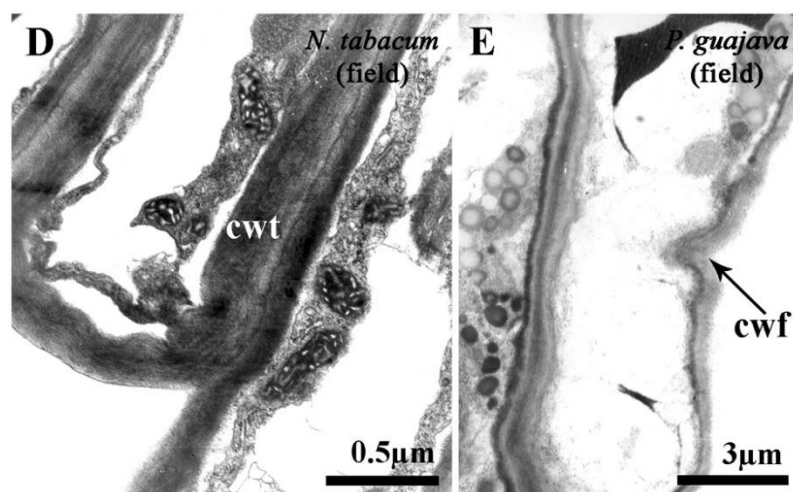
v nepoškozených rostlinách a poškození bylo tak dobře pozorovatelné (Obrázek 13).



Obrázek 13 – Řez listem *F. ornus* zobrazující adaxiální epidermis (UE), palisádový parenchym (PP), houbovitý parenchym (SP), abaxiální epidermis (LE) a cévní svazek (Ve). G zobrazuje asymptomatické listy z venkovních podmínek, H zobrazuje detail řezu listu ošetřeného ozónem. Na řezu G jsou patrné akumulované produkty sekundárního metabolismu v degradovaných buňkách palisádového parenchymu (\*). Převzato a upraveno podle (Paoletti et al., 2010)

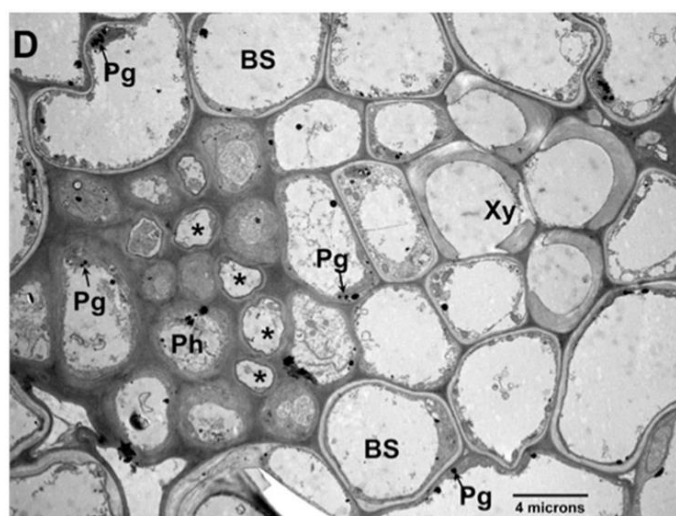
Nerovnoměrné barvení buněk mezofylu poukazuje na gradient buněčného poškození od palisádového parenchymu k níže uloženým vrstvám mezofylu (Paoletti et al., 2010).

Houbovitý parenchym po ošetření O<sub>3</sub> často vykazoval menší poškození než parenchym palisádový (Gao et al., 2016b). Např. u broskvoně zvýšené množství tloušťku houbovitého parenchymu nesnížilo (Dai et al., 2017). U některých rostlin však byly pozorovány častější změny ve tvaru buněčné stěny (bradavičnaté výstupky) u houbovitého parenchymu, než u parenchymu palisádového; u palisádového parenchymu však bylo pozorováno ztlustění buněčné stěny, nebo dokonce její vrstvení (Obrázek 14) (Alves et al., 2016).



Obrázek 14 – Detail listu *N. tabacum* (D) a *P. guajava* (E) z venkovních podmínek. Na detailech jsou patrná ztlustění BS (cwt) a záhyby BS (cwf). Převzato a upraveno podle (Alves et al., 2016)

Změny vyvolané  $O_3$  jsou detekovatelné i v cévních svazcích. Xylém v cévních svazcích není ovlivněn vyšší koncentrací  $O_3$  tolik, jako floém, jehož buňky mohou působením  $O_3$  měnit tvar (Obrázek 15). U rostlin vystavených vyšší koncentraci  $O_3$  může vzrůst depozice kalózy v některých člancích sítkovic (Gao et al., 2016b).



Obrázek 15 – Detail cévního svazku *R. pseudoaccacia* s poškozeným floémem. V některých člancích sítkovic (Ph) vzrostla depozice kalózy (\*); BS – cévní svazek, Pg – plastoglobuly, Xy - xylém. Převzato a upraveno podle (Gao et al., 2016a).

#### 4.3. Změny na úrovni celé rostliny

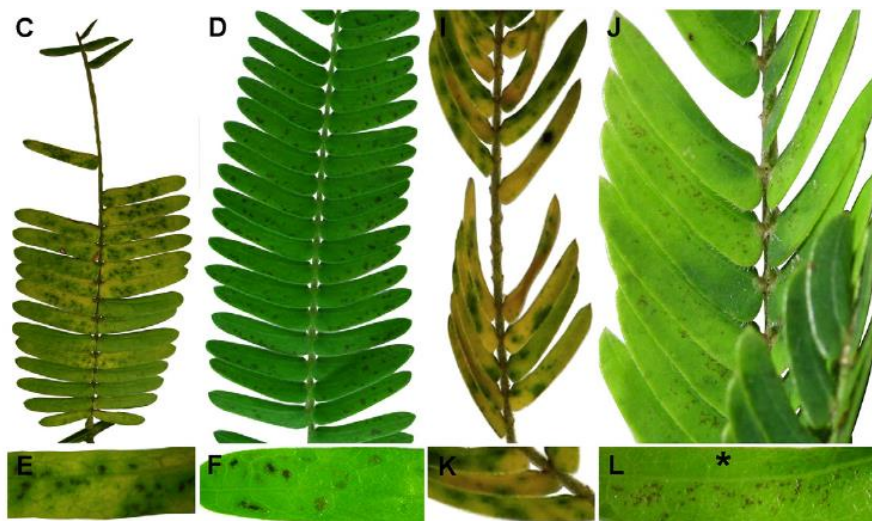
Poškození pletiv se promítá do makroskopických změn na listech, které jsou viditelné na vzhledu celé rostliny. Např. opadávání nebo zkroucení listů vypovídá o deformaci

celé rostliny, kterou již můžeme vidět pouhým okem a to i z větší dálky, než pod lupou či mikroskopem, jako tomu bylo např. u změn na úrovni buněk a pletiv.

Makroskopická poškození jsou dalším stupněm poškození mikroskopických, může se tedy zdát, že celá rostlina z pohledu většího měřítka slouží jen jako zrcadlo procesů, které se dějí na buněčné úrovni. I toto větší měřítko však hraje v příjmu  $O_3$  významnou roli, obzvláště v případě stromů, kde záleží na rozmístění listů v koruně. List rostoucí dále od kmene stromu a na spodnějších větvích koruny, bude pravděpodobně působení  $O_3$  vystaven jinak, než list rostoucí uprostřed koruny obklopený listy dalšími (více v kapitole 4.3.2).

### Makroskopická poškození listů

Makroskopická poškození listů  $O_3$  můžeme rozlišovat podle (Zhang et al., 2014b) do čtyř<sup>43</sup> stupňů: první stupeň, kdy se na listech objevují malé světle zelené, žlutavé nebo hnědé skvrny; při druhém stupni jsou na listech viditelné skvrny nekrotické. U třetího stupně se na listech tvoří chlorózy a u čtvrtého stupně listy celkově žloutnou, nebo žloutnou v okolí žilnatin. Tyto viditelné symptomy se často projevují na adaxiální straně listu (Obrázek 16). Čím delší bylo vystavení působení ozónu, tím více docházelo k poškození listu postupně od prvního až po čtvrtý stupeň. Nejvíce poškozené vyšší koncentrací  $O_3$  byly plně vyvinuté listy, u kterých se brzy vyvinulo poškození prvního stupně, nejodolnější byly listy, které se již vyvíjely pod vlivem ozónu od samého počátku (Pääkkönen et al., 1996).



Obrázek 16 – Viditelná poranění adaxiální strany listů *P. gonoacantha* způsobené zvýšenou koncentrací ozónu (C-F) a koncentrací ozónu ve venkovních podmínkách (I-L). Na adaxiální straně listů jsou viditelné hnědavé skvrny a chlorózy, tato poranění však nebyla pozorována u zastíněných listů (\*). Převzato a upraveno podle (Moura et al., 2018)



## Efekt pozice listů v koruně stromu při poškození způsobeném zvýšenou koncentrací O<sub>3</sub>

Poranění listů se liší podle délky časového úseku, po který jsou působení O<sub>3</sub> listy vystaveny, svoji roli v ochraně hraje antioxidační kapacita, tloušťka buněčné stěny a další faktory (např. role peroxizomů). Pokud se však podíváme blíže na stromy, míra poškození se liší i v rámci jejich koruny. Tyto rozdíly mohou být způsobeny díky mikroklimatu koruny, fyziologických funkcí nebo anatomii listu, které se v určitých částech koruny stromu liší (Larcher, 2003).

Podle studií prováděných na kalině (*Viburnum lantana* L.), dubu (*Quercus rubra* L.), topolu (*Populus nigra* L.) nebo jasanu (*Fraxinus excelsior* L.) má zvýšená hladina O<sub>3</sub> větší efekt na spodní část koruny stromů (Novak et al., 2005; Samuelson and Edwards, 1993). Z těchto výsledků vyplývá, že O<sub>3</sub> proniká rychleji průduchy na listech ve spodní části koruny, protože jsou lokalizované níže a listy rostoucí ve vyšších vrstvách koruny jsou těmi spodními chráněny. Protože listy ve spodní části koruny jsou zároveň působení vyšší koncentrace O<sub>3</sub> vystaveny déle, jejich poškození je větší než u listů rostoucích výše. Zároveň O<sub>3</sub> proniká do listu méně přes adaxiální strany listu díky vrstvě kutikuly a u dorziventrálního listu víceletých dřevin díky absenci průduchů na adaxiální straně listu, jak je již psáno v předchozích kapitolách.

Zajímavé výsledky byly pozorovány na stálezeleném dubu *Cyclobalanopsis glauca*, kdy se po vystavení sazenic vyšší koncentraci O<sub>3</sub> zvýšila vodivost průduchů ve vyšších vrstvách koruny a zavření průduchů bylo zaznamenáno jen u mladých listů ve středu koruny (Zhang et al., 2014b). Zároveň se ve vyšších vrstvách koruny dubu signifikantně snížilo množství chlorofylu a rychlost čisté fotosyntézy oproti ostatním vrstvám koruny. Tento úbytek je dle (Zhang et al., 2014b) vysvětlen tím, že zvýšená koncentrace O<sub>3</sub> zvýšila rozptýlení energie ze slunečního záření v anténním komplexu, což vedlo k úbytku excitační energie potřebné k primární fázi fotosyntézy. Pozorování úbytku chlorofylu a snížení rychlosti fotosyntézy ve vrchních vrstvách koruny stálezeleného dubu je vysvětleno tím, že listy opadavých stromů mají jiné vlastnosti než listy stromů stálezelených (Zhang et al., 2014b).

## 5. Vliv ontogeneze na citlivost k O<sub>3</sub>, aklimace

Z nastudované literatury je patrné, že různé rody a druhy rostlin, dokonce i jednotlivé listy na jedné rostlině jsou různě citlivé na vliv ozónu. V rámci jedné rostliny se jednalo o různá vývojová stadia listů, mezi jednotlivými rody a druhy šlo zejména o rozdíl mezi opadavými a stálezelenými stromy.

Ohledně jednotlivých listů u jedné rostliny se studie shodují na tom, že listy, které se začaly vyvíjet v době, kdy byla koncentrace O<sub>3</sub> vyšší, byly méně poškozené, než starší listy, které se vyvíjely ještě před zvýšením koncentrace O<sub>3</sub>. Listy vyvinuté v průběhu ošetření O<sub>3</sub> na jeho zvýšenou koncentraci odpovídaly vyšší hustotou průduchů na pokožce a také jejich pomalejším otevíráním (Pääkkönen et al., 1996). Naopak výrazněji se negativní změny projevovaly na listech, které se začaly vyvíjet před tím, než se koncentrace O<sub>3</sub> zvýšila, a svůj vývoj již dokončily v průběhu ozonizace (Zhang et al., 2012). Tento jev je pravděpodobně způsobený aklimací – zatímco plně vyvinuté listy nejsou schopné tak efektivně odpovídat na zvýšené dávky O<sub>3</sub>, listy, které se v tomto prostředí vyvíjí od počátku, jsou přizpůsobené na co nejmenší kontakt s molekulami O<sub>3</sub> a tedy minimalizaci následného poškození. Listy, které se začnou vyvíjet ještě v době, kdy není koncentrace O<sub>3</sub> zvýšená a zvýší se v průběhu jejich vývoje, jsou pravděpodobně nejcitlivější, protože ještě nejsou aklimatizované jako nové listy, zároveň však nejsou schopné svá pletiva detoxifikovat se stejnou účinností jako listy staré.

Není to však jen stádium vývoje listu, co moduluje vliv zvýšené koncentrace O<sub>3</sub>. U stromů také záleží na tom, jestli je druh opadavý, či stálezelený. Zatímco u listů opadavých stromů je celý vývoj započat, ale zároveň ukončen, během jednoho vegetačního období, listy stálezelených stromů zůstávají na větvích po několik sezón a je tedy důležitější, aby uměly reagovat na zvýšenou koncentraci O<sub>3</sub> jinak, než stromy opadavé, u kterých byla v reakci na O<sub>3</sub> sledována vyšší senescence (Zhang et al., 2012). Listy stálezelených stromů nedokáží odpovídat tak dynamicky shozením a opětovným vývojem mladých listů, mají proto zvýšenou detoxifikační kapacitu a aklimace se u nich projeví až po delší expozici O<sub>3</sub>, většinou v dalším vegetačním období, kdy jsou nové asimilační orgány přizpůsobené vyššímu oxidačnímu stresu (Zhang et al., 2014b). Zároveň díky své schopnosti listy efektivněji detoxifikovat, jsou listy stálezelených stromů na zvýšené koncentrace O<sub>3</sub> ve vzduchu méně citlivé, než listy opadavých stromů (Calatayud et al., 2011a).

## 6. Závěr

V současnosti díky vlivu probíhající klimatické změny a zároveň působením lidské činnosti vzrůstá koncentrace troposférického ozónu, který působí negativně na živé organismy včetně rostlin. Ozón je však vysoce reaktivní molekula s krátkou životností a rozpadá se na reaktivní formy kyslíku, které jsou schopné interagovat s buněčnými kompartmenty. Ozón je tedy spíše jakýmsi prekurzorem vedoucím ke změnám v listech a poškození jsou jím způsobena nepřímo.

Odpověď na oxidativní stres je u různých čeledí, rodů ale i druhů rostlin rozdílná, stejně tak jako následná míra poškození listů. U rostlin dochází k rychlejšímu zavírání průduchů, snižuje se jejich vodivost a do mezofylu se tak dostává menší objem ozónu. U některých rostlin byla na povrchu pokožky pozorována vyšší hustota průduchů, což umožňuje rostlině rozptýlit přijímané množství ozónu po celé ploše listu a zamezit většímu poškození. I přes tato omezení toku ozónu do listů se však listy neochrání dokonale a poškození ve struktuře listu vznikají. Na listech je patrné žloutnutí, chlorózy a nekrózy. Tato makroskopická poškození jsou ukazatelem změn listového mezofylu, která jsou však také tvořena souborem poškození jednotlivých buněk. V mezofylových buňkách jsou pozorovány změny v tvaru a velikosti chloroplastů, vyšší hromadění plastoglobulů a škrobových zrn, dále jsou často pozorovány změny v mitochondriích, peroxizomech, vakuolách, ale také buněčné stěně a plazmatické membráně.

Všeobecně oxidativní stres snášejí lépe stálezelené stromy a keře, citlivost se ale také může lišit mezi kultivary jednoho druhu rostliny. Na téma citlivosti u různých kultivarů jsem objevila jen malý počet studií, soudím tedy, že toto téma není dostatečně prozkoumané. Probíhající klimatická změna a masivní produkce oxidů dusíku díky antropogenní činnosti však pravděpodobně bude mít velký vliv na stoupající koncentrace ozónu ve vzduchu i do budoucna, a proto by zmapování rozdílů v citlivosti různých druhů rostlin a v případě zemědělsky nebo zahradnický významných druhů i různých kultivarů mohlo být do budoucna velmi přínosné z hlediska zemědělství, ale i krajinářství či urbanismu.

## Seznam zdrojů a použité literatury

Al Razi, K., and Moritomi, H. (2013). Numerical simulation for regional ozone concentrations: A case study by weather research and forecasting/chemistry (WRF/Chem) model. *Int. J. ENERGY Environ.* 4.

Alves, E.S., Moura, B.B., Pedroso, A.N.V., Tresmondi, F., and Machado, S.R. (2016). Cellular markers indicative of ozone stress on bioindicator plants growing in a tropical environment. *Ecol. Indic.* 67, 417–424.

Bussotti, F., Agati, G., Desotgiu, R., Matteini, P., and Tani, C. (2005). Ozone foliar symptoms in woody plant species assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytol.* 166, 941–955.

Bussotti Filippo, Agati Giovanni, Desotgiu Rosanna, Matteini Paolo, and Tani Corrado (2005). Ozone foliar symptoms in woody plant species assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytol.* 166, 941–955.

Calatayud, V., Cerveró, J., Calvo, E., García-Breijo, F.-J., Reig-Armiñana, J., and Sanz, M.J. (2011a). Responses of evergreen and deciduous *Quercus* species to enhanced ozone levels. *Environ. Pollut.* 159, 55–63.

Calatayud, V., Cerveró, J., Calvo, E., García-Breijo, F.-J., Reig-Armiñana, J., and Sanz, M.J. (2011b). Responses of evergreen and deciduous *Quercus* species to enhanced ozone levels. *Environ. Pollut.* 159, 55–63.

Cotrozzi, L., Pellegrini, E., Guidi, L., Landi, M., Lorenzini, G., Massai, R., Remorini, D., Tonelli, M., Trivellini, A., Vernieri, P., et al. (2017). Losing the Warning Signal: Drought Compromises the Cross-Talk of Signaling Molecules in *Quercus ilex* Exposed to Ozone. *Front. Plant Sci.* 8.

Dai, L., Li, P., Shang, B., Liu, S., Yang, A., Wang, Y., and Feng, Z. (2017). Differential responses of peach (*Prunus persica*) seedlings to elevated ozone are related with leaf mass per area, antioxidant enzymes activity rather than stomatal conductance. *Environ. Pollut.* 227, 380–388.

Del Rio, D., Stewart, A.J., and Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15, 316–328.

Evans, N.H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M., and Knight, M.R. (2005a). ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response. *Plant J.* 41, 615–626.

Evans, N.H., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M., and Knight, M.R. (2005b). ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response. *Plant J.* 41, 615–626.

Gao, F., Calatayud, V., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, J., and Feng, Z. (2016a). Effects of elevated ozone on physiological, anatomical and ultrastructural characteristics of four common urban tree species in China. *Ecol. Indic.* *67*, 367–379.

Gao, F., Calatayud, V., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, J., and Feng, Z. (2016b). Effects of elevated ozone on physiological, anatomical and ultrastructural characteristics of four common urban tree species in China. *Ecol. Indic.* *67*, 367–379.

Heath, R.L., and Taylor, G.E. (1997). Physiological Processes and Plant Responses to Ozone Exposure. In *Forest Decline and Ozone*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 317–368.

Hoshika, Y., Carriero, G., Feng, Z., Zhang, Y., and Paoletti, E. (2014). Determinants of stomatal sluggishness in ozone-exposed deciduous tree species. *Sci. Total Environ.* *481*, 453–458.

Jolivet, Y., Bagard, M., Cabané, M., Vaultier, M.-N., Gandin, A., Afif, D., Dizengremel, P., and Thiec, D.L. (2016). Deciphering the ozone-induced changes in cellular processes: a prerequisite for ozone risk assessment at the tree and forest levels. *Ann. For. Sci.* *73*, 923–943.

Kadono, T., Tran, D., Errakhi, R., Hiramatsu, T., Meimoun, P., Briand, J., Iwaya-Inoue, M., Kawano, T., and Bouteau, F. (2010). Increased Anion Channel Activity Is an Unavoidable Event in Ozone-Induced Programmed Cell Death. *PLOS ONE* *5*, e13373.

Krupa, S.V., and Manning, W.J. (1988). Atmospheric ozone: Formation and effects on vegetation. *Environ. Pollut.* *50*, 101–137.

Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups* (Springer Science & Business Media).

Maier-Maercker, U. (1989). Delignification of subsidiary and guard cell walls of *Picea abies* (L.) Karst. by fumigation with ozone. *Trees* *3*, 57–64.

McAdam, E.L., Brodribb, T.J., and McAdam, S.A.M. (2017). Does ozone increase ABA levels by non-enzymatic synthesis causing stomata to close? *Plant Cell Environ.* *40*, 741–747.

Moura, B.B., Alves, E.S., Marabesi, M.A., de Souza, S.R., Schaub, M., and Vollenweider, P. (2018). Ozone affects leaf physiology and causes injury to foliage of native tree species from the tropical Atlantic Forest of southern Brazil. *Sci. Total Environ.* *610–611*, 912–925.

Musselman, R.C., and Massman, W.J. (1998). Ozone flux to vegetation and its relationship to plant response and ambient air quality standards. *Atmos. Environ.* *33*, 65–73.

Musselman, R.C., and Minnick, T.J. (2000). Nocturnal stomatal conductance and ambient air quality standards for ozone. *Atmos. Environ.* *34*, 719–733.

Novak, K., Schaub, M., Fuhrer, J., Skelly, J.M., Hug, C., Landolt, W., Bleuler, P., and Kräuchi, N. (2005). Seasonal trends in reduced leaf gas exchange and ozone-induced foliar injury in three ozone sensitive woody plant species. *Environ. Pollut.* 136, 33–45.

Oksanen, E., Häikiö, E., Sober, J., and Karnosky, D.F. (2004a). Ozone-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytol.* 161, 791–799.

Oksanen, E., Häikiö, E., Sober, J., and Karnosky, D.F. (2004b). Ozone-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytol.* 161, 791–799.

Pääkkönen, E., Metsärinne, S., Holopainen, T., and Kärenlampi, L. (1996). The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. *New Phytol.* 132, 145–154.

Paoletti, E., Contran, N., Bernasconi, P., Günthardt-Goerg, M.S., and Vollenweider, P. (2010). Erratum to “Structural and physiological responses to ozone in Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) leaves of seedlings and mature trees under controlled and ambient conditions.” *Sci. Total Environ.* 408, 2014–2024.

Paoletti, E., Contran, N., Bernasconi, P., Günthardt-Goerg, M.S., and Vollenweider, P. Erratum to “Structural and physiological responses to ozone in Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) leaves of seedlings and mature trees under controlled and ambient conditions.”

Pellegrini, E., Francini, A., Lorenzini, G., and Nali, C. (2015a). Ecophysiological and antioxidant traits of *Salvia officinalis* under ozone stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13083–13093.

Pellegrini, E., Francini, A., Lorenzini, G., and Nali, C. (2015b). Ecophysiological and antioxidant traits of *Salvia officinalis* under ozone stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13083–13093.

Pellinen, R., Palva, T., and Kangasjärvi, J. (1999). Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J.* 20, 349–356.

Praus, P., Matys, J., and Kozák, O. (2012). Photocatalytic decomposition of phenol by nanocomposite of ZnS nanoparticles and montmorillonite. *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 1900–1906.

Samuelson, L.J., and Edwards, G.S. (1993). A comparison of sensitivity to ozone in seedlings and trees of *Quercus rubra* L. *New Phytol.* 125, 373–379.

Torsethaugen, G., Pell, E.J., and Assmann, S.M. (1999). Ozone inhibits guard cell K<sup>+</sup> channels implicated in stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13577–13582.

Ueda, Y., Uehara, N., Sasaki, H., Kobayashi, K., and Yamakawa, T. (2013). Impacts of acute ozone stress on superoxide dismutase (SOD) expression and reactive oxygen species (ROS) formation in rice leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 70, 396–402.

Vaultier, M.-N., and Jolivet, Y. (2015). Ozone sensing and early signaling in plants: An outline from the cloud. *Environ. Exp. Bot.* 114, 144–152.

Yang, N., Wang, X., Zheng, F., and Chen, Y. (2017a). The response of marigold (*Tagetes erecta* Linn.) to ozone: impacts on plant growth and leaf physiology. *Ecotoxicology* 26, 151–164.

Yang, N., Wang, X., Zheng, F., and Chen, Y. (2017b). The response of marigold (*Tagetes erecta* Linn.) to ozone: impacts on plant growth and leaf physiology. *Ecotoxicology* 26, 151–164.

Zhang, W., Feng, Z., Wang, X., and Niu, J. (2012). Responses of native broadleaved woody species to elevated ozone in subtropical China. *Environ. Pollut.* 163, 149–157.

Zhang, W., Feng, Z., Wang, X., and Niu, J. (2014a). Elevated ozone negatively affects photosynthesis of current-year leaves but not previous-year leaves in evergreen *Cyclobalanopsis glauca* seedlings. *Environ. Pollut.* 184, 676–681.

Zhang, W., Feng, Z., Wang, X., and Niu, J. (2014b). Elevated ozone negatively affects photosynthesis of current-year leaves but not previous-year leaves in evergreen *Cyclobalanopsis glauca* seedlings. *Environ. Pollut.* 184, 676–681.

Zouzoulas, D., Koutroubas, S.D., Vassiliou, G., and Vardavakis, E. (2009). Effects of ozone fumigation on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology, anatomy, physiology, yield and qualitative characteristics of fibers. *Environ. Exp. Bot.* 67, 293–303.

### Internetové zdroje

VESELÝ, Michal. *Přízemní ozon a jeho účinky na fotografie* [online]. In: . [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/prizemni-ozon-a-jeho-ucinky-na-fotografie>

*Why Is The Ozone Layer Higher Up In The Atmosphere Than Oxygen?* [online]. In: . [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <https://www.scienceabc.com/eyeopeners/why-is-the-ozone-layer-higher-up-in-the-atmosphere-than-oxygen.html>